UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

G. Quinkert: Die Stabilitätenreihenfolge der stereoisomeren Hydrindan- und Hydrindanon-Verbindungen 381

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

H. Bieri: Ein (M,F)-Problem (Schluss) 389

C. Neuberg† and Amélie Grauer: The Problem of Solubilization and Precipitation and the Calcium and Phosphorus Cycle in Cavern Formation 391

E. E. Shult and C. C. Lindegren: The Localized Crossover and a New Hypothesis of Chromosomal Interference 393

P. Šadoğlu: A Mendelian Gene for Albinism in Natural Cave Fish 394

M. Hill: Morphological Effects of the Secretion of Histamine and Mucopolysaccharides by Mast Cells 395

J. Šmarda and D. Wiedermann: Ultrafiltration Measurement of Paraprotein Particles in Four Cases of Macroglobulinemia 397

A. Monroy: Swelling Properties of the Mitochondria of Unfertilized and Newly Fertilized Sea Urchin Eggs 398

A. Frey-Wyssling und S. Bäbler: Zur Biochemie des Gewächshaustabaks 399

A. Hunger, J. Kebrle, A. Rossi und K. Hoffmann: Synthese basisch substituierter, analgetisch wirksamer Benzimidazol-Derivate 400

F. Gross und H. Turrian: Über Benzimidazolderivate mit starker analgetischer Wirkung 401

J. E. Banfield: Kinetics of Penicillinase Activity . . 403

G. E. Graf: Biochemical Predetermination in *Drosophila* 404

R. Knapp: Vegetative Entwicklung und Fertilität einiger annueller Pflanzenarten unter dem Einfluss verschiedener konstanter Temperaturen 405

P. Fasella, C. Baglioni e C. Turano: Nuovo tampone volatile da impiegarsi in cromatografia ed elettroforesi 406

J. Nemec, H. Polák, J. Neuwirth, Z. Zita, and P. Blažková: Motility of Leukocytes in Slide Cells . . 407

G. Ludány, A. Döklen und E. Tóth: Die Beeinflussung der Leukozytenphagozytose mit Phlorrhizin . 409

G. Ludány, Gy. Vajda und A. Döklen: Weitere Untersuchungen über die Wirkung von ACTH auf die Phagozytose der Leukozyten 410

A. S. Johansson: Neurosecretion and Metamorphosis in the Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) 410

F. A. Soliman and Lucy Soliman: The Gonadotrophic Activity of Date Palm Pollen Grains 411

H. M. Badawi and F. A. Soliman: The Influence of Oestrogen and Progesterone on Pituitary Function 412

A. Hrbek: Wirkung des Neurotoxins *Shigella Shigae* auf die Krampfbereitschaft 414

R. Eccles and A. Lundberg: Integrative Pattern of Reflex Actions by Impulses in Large Muscle Spindle Afferents on Motoneurones to Hip Muscles 414

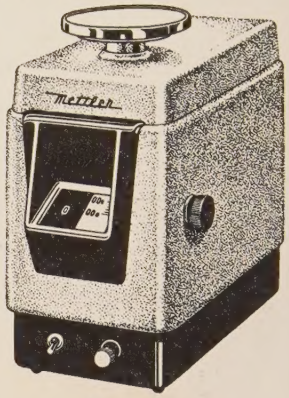
A. Pasinetti and C. Giori: New Method for Determination of Radioactivity in Vegetal and Animal Tissues 415

E. Nakano and A. Monroy: A Method for the Incorporation of Radioactive Isotopes in the Sea Urchin Egg 416

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Bericht über die 4. Tagung für Elektronenmikroskopie des Schweizer Komitees für Optik am 23. Mai 1957 in Zürich . 417

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich



Die modernen Schnellwaagen für Industrie Gewerbe und Handel

P 1

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIII/ 10

Birkhäuser AG., Basel
Theodor Christ AG., Basel
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
J. R. Geigy AG., Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz A. G., Basel
Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 44.–; other countries sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1957 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 235820; Telegrammadresse: Edita Basel

---

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

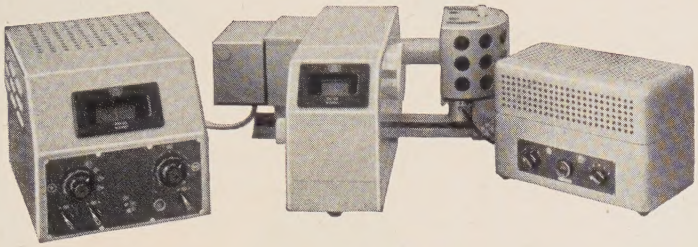
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

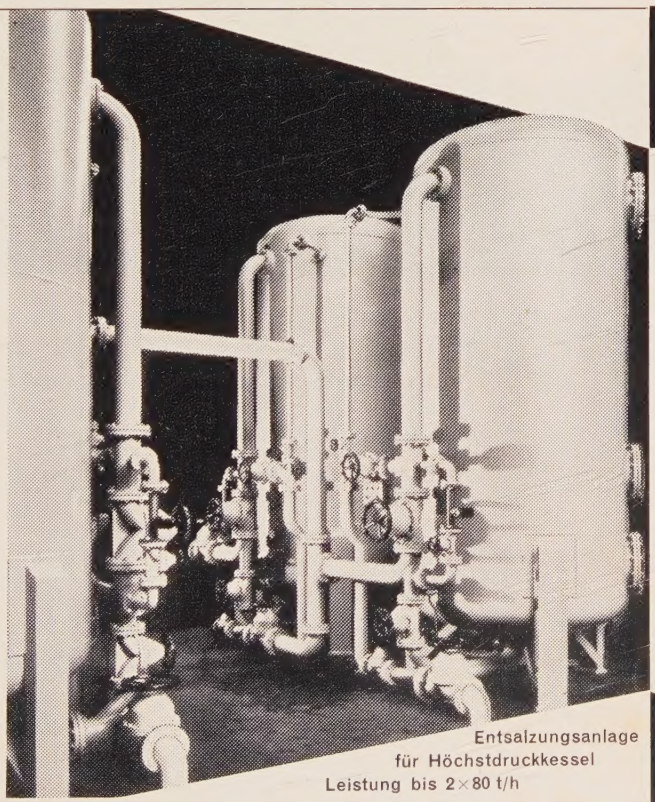
Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr).
- **Meßbereich:** 200–2500 mμ.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1P28 und PbS-Photo-Widerstand.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** mit nur 0,2 cm^3 Füllvolumen pro Zentimeter Schichtlänge.
- **Flammen-, Fluoreszenz-, Remissions- und Chromatogrammzusätze.**

GANZ & CO
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73
Zürich



Entsalzungsanlage
für Höchstdruckkessel
Leistung bis 2×80 t/h

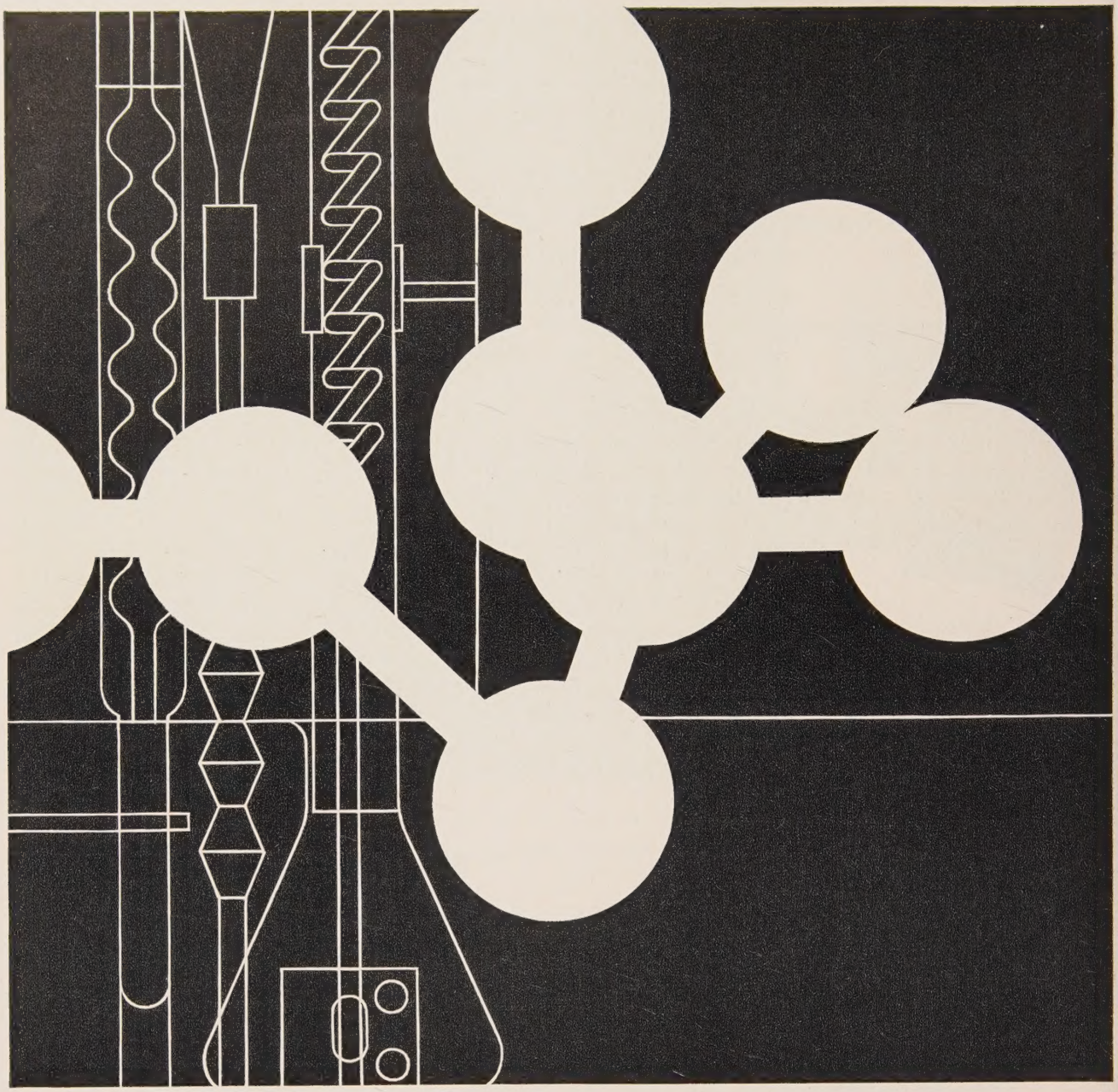
THEODOR CHRIST AG, BASEL
Engelgasse 77 Telephon (061) 23 19 70

Über 250

Wasserentsalzungsanlagen liefern reinstes Wasser für

Höchstdruckkessel,
chemische und
pharmazeutische
Industrie und
viele andere Betriebe

*



A 5

Geigy

Die Geigy-Erzeugnisse, seien es Farbstoffe, Textilchemikalien, synthetische Gerbstoffe, Produkte für Schädlingsbekämpfung und Pflanzenschutz oder pharmazeutische Spezialitäten, geniessen das uneingeschränkte Vertrauen von Millionen von Verbrauchern in der ganzen Welt. Dieser Erfolg ist das Ergebnis einer mit den letzten Erkenntnissen von Wissenschaft und Technik übereinstimmenden Tätigkeit in unsern Forschungs- und Produktionsstätten.

J. R. Geigy A.G., Basel

Geigy

EXPERIENTIA

Vol. XIII - Fasc. 10 Pag. 381–420 15. X. 1957

Die Stabilitätenreihenfolge der stereoisomeren Hydrindan- und Hydrindanon-Verbindungen

Von G. QUINKERT*

Die in den letzten Jahren systematisch und mit grossem Erfolg ausgeweitete Konstellationsanalyse[1] stellt einmal ein Hilfsmittel dar, die Richtung und Leichtigkeit von Reaktionsabläufen zu deuten und gegebenenfalls vorauszusagen, und gibt ausserdem Auskunft über die Stabilitätenreihenfolge verschiedener geometrischer Isomeren. Diese moderne Betrachtungsweise geht von der Geometrie einfacher organischer Moleküle aus, die mit Hilfe verschiedenartiger physikalischer Strukturbestimmungen[2] ermittelt werden kann, und basiert auf der Erkenntnis, dass die chemischen und physikalischen Eigenarten eines Moleküls in einem ursächlichen Zusammenhang mit dessen als bevorzugt erkannter Konstellation stehen.

Zur Ermittlung des Energiegehaltes eines Stereoisomeren gilt es, die Geometrie des Grundgerüstes in bekannte Konstellationen ganz einfacher Moleküle aufzulösen. Als geeignete Bezugssysteme dienen die Rotationsisomeren des Äthans[3] mit maximaler («staggered» Konstellation) bzw. minimaler Stabilität («eclipsed» Konstellation) oder die drei durch ihren Energiegehalt charakterisierten «staggered», «skew» und völlig «eclipsed» Rotationsisomeren des *n*-Butans[4].

Man untersucht also, um welchen Winkel die an zwei benachbarten C-Atomen befindlichen Valenzen in der senkrecht zu ihrer Verbindungslinie orientierten Projektionsebene gegeneinander verdreht sind, bzw. man teilt das betreffende Molekül in die maximale Anzahl von *n*-Butan-Bruchstücken und ermittelt die Häufigkeit und den Charakter ihrer Konstellationen. So erfährt man relative, die Pitzer-Spannung betreffende Aussagen über den Energiegehalt der jeweiligen Verbindung. Berücksichtigt man darüber hinaus die jeweils auftretende Baeyer-Spannung, so erfasst man bei den normalen Ringsystemen die gesamten Spannungsursachen[5] und erhält als Differenz der Stabilitäten zweier stereoisomerer Verbindungen den absoluten Energiedifferenzwert.

* Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule, Braunschweig.

[1] D. H. R. BARTON und R. C. COOKSON, Quart. Rev. *10*, 44 (1956); dort weitere Literaturangaben. – W. G. DAUBEN und K. S. PITZER in *Steric Effects in Organic Chemistry* (M. S. Newman, John Wiley & Sons, New York 1956). – W. KLYNE, *Progress in Stereochemistry* (Butterworth, London 1954).

[2] J. C. MC COUBREY und A. R. UBBELOHDE, Quart. Rev. *5*, 36 (1951). – E. A. BRAUDE und F. C. NACHOD, *Determination of Organic Structures by Physical Methods* (Academic Press, New York 1955).

[3] J. C. MC COUBREY und A. R. UBBELOHDE, Quart. Rev. *5*, 36 (1951). – S. MIZUSHIMA, *Internal Rotations and the Structure of Molecules* (Academic Press, New York 1954).

[4] Es wird hier die in der englischen Fachliteratur gebräuchliche Nomenklatur verschiedener Rotationsisomeren verwendet. Die geometrische Definition der in diesem Zusammenhang interessierenden verschiedenen Konstellationen des Äthans bzw. *n*-Butans geht aus nachfolgender Übersicht hervor:

Äthan

«staggered» Konstellation (A): 3 gleichartige H–C–C–H-Gruppierungen sind coplanar transoid orientiert;

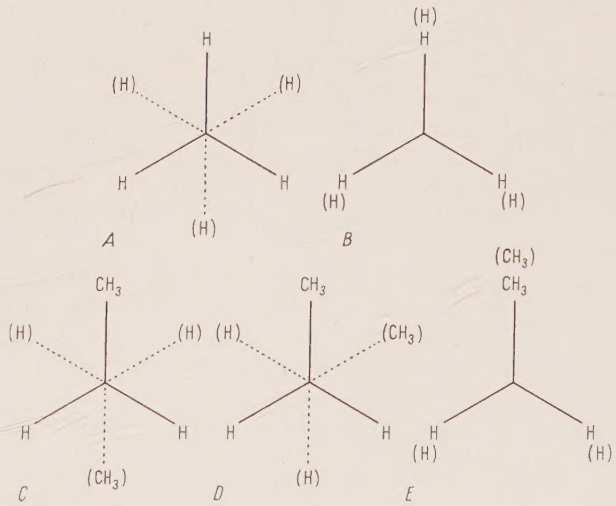
«eclipsed» Konstellation (B): 3 gleichartige H–C–C–H-Gruppierungen sind coplanar cisoid orientiert;

n-Butan

«staggered» Konstellation (C): Die CH_3–C–C–CH_3-Gruppierung ist coplanar transoid orientiert;

«skew» Konstellation (D): Die H–C–C–H-Gruppierung ist coplanar transoid orientiert.

völlig «eclipsed» Konstellation (E): Die CH_3–C–C–CH_3-Gruppierung ist coplanar cisoid orientiert.



[5] Einer Absprache zwischen H. C. BROWN und V. PRELOG [J. Amer. chem. Soc. *73*, 215 (1951)] gemäss bezeichnet man die 5-, 6- und 7gliedrigen Ringsysteme als gewöhnliche Ringe. Unter der bei diesen zyklischen Verbindungen auftretenden Spannung versteht man einmal die Abweichung der an der Ringbildung beteiligten Valenzwinkel vom jeweiligen energetisch begünstigten Wert: Baeyer-Spannung; die Valenzwinkel der sp^3-hybridisierten C-Atome sind bei 109° 28′ spannungsfrei, diejenigen der sp^2-hybridisierten C-Atome bei einem Wert von 120°. Als zweite Ursache einer Ringspannung gilt das Auftreten repulsiver Kräfte, die von Atomen oder Atomgruppen ausgehen, die nicht unmittelbar miteinander verbunden sind, sondern sich an benachbarten und übernächsten usw. C-Atomen befinden: Pitzer-Spannung.

Im Bizyklo(4:3:0)-nonan-System sind ein Zyklohexan- und ein Zyklopentanring in 1,2-Stellung miteinander verknüpft. In der starren, hochsymmetrischen Sessel-Konstellation des Kohlenstoff-6-Ringes mit dreizähliger Symmetrieachse sind die C–H-Valenzen der einander benachbarten Kohlenstoffatome jeweils um 60° gegeneinander verdreht. Die Abstände zwischen den an nachbarständigen Kohlenstoffatomen befindlichen Wasserstoffatomen erreichen dadurch, übereinstimmend mit der stabilen («staggered») Konstellation des Äthans, ihren Höchstwert, und das Ringsystem ist spannungsfrei im Sinne der Pitzer-Spannung. Aber auch Baeyer-Spannung liegt hier nicht vor, da die an der Ringbildung beteiligten Valenzen den begünstigten Tetraederwinkel einschliessen. Das Fehlen jeglicher Spannung äussert sich in der praktischen Übereinstimmung der Verbrennungswärme pro CH_2-Gruppe mit dem für offenkettige, gesättigte Kohlenwasserstoffe ermittelten Wert.

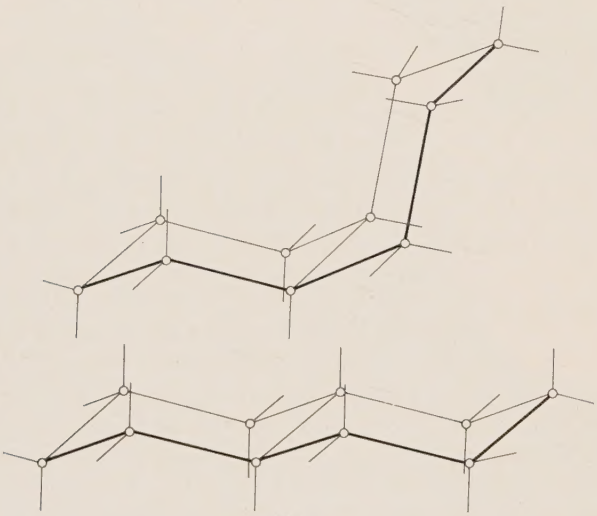


Abb. 1

Durch Anwendung der von PITZER[6] aufgefundenen Energiedifferenzwerte zwischen den «staggered», «skew» und völlig «eclipsed» Konstellationen des *n*-Butans (0,8 bzw. 3,6 kcal/Mol) entwickelte TURNER[7] eine empirische Methode zur Ermittlung der Stabilitätsunterschiede zwischen den verschiedenen stereoisomeren polyzyklischen Zyklohexanverbindungen. Durch einfaches Abzählen der im Decalin *trans*/*cis*-Isomerenpaar auftretenden Konstellationen des *n*-Butans erhält man drei zusätzliche «skew»-Anordungen für das *cis*-Produkt, die beim *trans*-Isomeren nicht auftreten. Daraus resultiert eine um etwa 2,4 kcal/Mol grössere Stabilität der letzteren Verbindung. Diese Betrachtungen sind auf die Decalin-Stereoisomeren mit angularer Methylgruppe[7] sowie auf die möglichen Perhydroanthracene und Perhydrophenanthrene[8] ausgedehnt worden. Beim 9-Methyl-decalin bewirkt die Einführung der angularen Methylgruppe zusätzliche «skew»-Anordnungen des *n*-Butans; bei der *trans*-verknüpften Verbindung sind es vier, beim *cis*-Produkt dagegen nur zwei, so dass sich der Energieunterschied auf etwa 0,8 kcal/Mol erniedrigt.

Die Turnersche Methode ist deshalb in einfacher Weise auf polykondensierte Zyklohexanverbindungen anwendbar, weil sowohl bei der gestreckten *trans*- wie bei der gewinkelten *cis*-verknüpften Form, zum Beispiel des Decalins (Abb. 1), ausschliesslich C–C-Bindungen in der «staggered» Konstellation des Äthans auftreten. Für die in 1,2-Stellung erfolgende Ankondensation eines 5-Ringes an einen Zyklohexanring gilt dies nicht.

Zyklopentan ist nicht wie sein höheres Homologe in der Lage, die «staggered» Zickzackkette auszubilden.

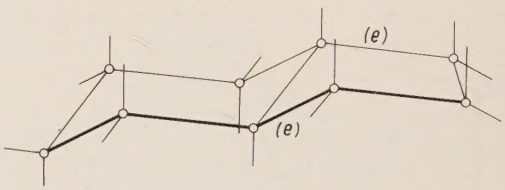


Abb. 2*a*

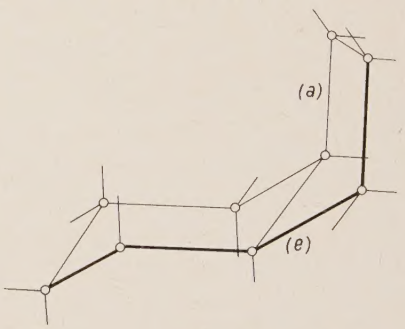


Abb. 2*b*

Um eine Winkelspannung zu vermeiden, müssen alle Ring-C-Atome in einer Ebene liegen. Bei einer derartigen Konstellation erreicht der Energiegehalt mit der repulsiven Einwirkung der an benachbarten Kohlenstoffatomen befindlichen Wasserstoffatome aufeinander ein Maximum. In der stabilsten Konstellation des Zyklopentans sind beide Spannungsursachen wirksam[9]; vier Ringatome liegen in einer gemeinsamen Ebene, das fünfte (nicht immer ein und dasselbe) ragt aus ihr heraus[10].

Die Verknüpfung eines Zyklohexanringes mit einem Zyklopentanring in der Art des Hydrindans kann sowohl *trans*- wie *cis*-orientiert sein; im ersteren Fall (Abb. 2*a*) sind zwei äquatoriale Bindungen beteiligt, im letzteren (Abb. 2*b*) eine äquatoriale und eine axiale. Fasst man das bizyklische System als eine 1,2-substi-

[6] K. S. PITZER, Chem. Reviews *27*, 39 (1940).
[7] R. B. TURNER, J. Amer. chem. Soc. *74*, 2118 (1952).
[8] W. S. JOHNSON, Exper. *8*, 315 (1951); J. Amer. chem. Soc. *75*, 1498 (1953); Chem. and Ind. *1956*, 167.
[9] J. G. ASTON, S. C. SCHUMANN, H. L. FINK und P. M. DOTY, J. Amer. chem. Soc. *63*, 2029 (1941). – J. G. ASTON, H. L. FINK und S. C. SCHUMANN, J. Amer. chem. Soc. *65*, 341 (1943).
[10] K. S. PITZER, Science *101*, 672 (1945).

tuierte Zyklohexanverbindung[11] oder als eine 1,2-substituierte Zyklopentanverbindung[12] auf, so sollte *trans*-Hydrindan stabiler sein als das *cis*-Isomere. Dies ist auch tatsächlich der Fall[13], denn wie beim Decalin bewirkt die gewinkelte Form der *cis*-Verknüpfung einen stärker ausgeprägten «skew»-Charakter. Die Energiedifferenz der stereoisomeren Hydrindane ist jedoch merklich niedriger[14] als beim Decalin-Isomerenpaar. Der Grund liegt darin, dass sich die beiden Ringe des Hydrindans in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Verknüpfung verschiedenartig in ihrer Geometrie und damit in ihren Spannungsverhältnissen beeinflussen.

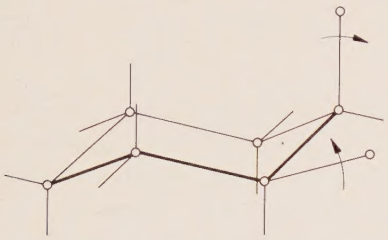


Abb. 3

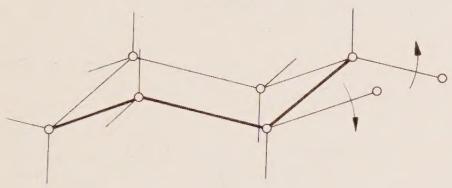


Abb. 4

Zur *cis*-Anordnung des Fünfringes in bezug auf den Zyklohexanring müssen die äquatoriale Bindung des einen und die axiale Bindung des benachbarten Kohlenstoffatoms einander genähert werden (Abb. 3). Die dadurch bewirkte Deformation der Sessel-Konstellation führt zu ihrer Abflachung, und es entsteht eine Konstellation, die bei der Transformation einer Sessel-Form in die zugehörige andere Sessel-Form durchlaufen wird und einen vergrösserten Abstand der 1,3-diaxialen Atome aufweist[15].

Die Frage, ob die Gesamtspannung nicht dadurch auf ein Mindestmass gebracht werden kann, indem der 6-Ring, die einmal eingeschlagene Richtung weiter befolgend, Boot-Konstellation annimmt und der 5-Ring dadurch jede zusätzliche Spannung verliert, ist intensiv diskutiert worden[16]. DREIDING[17] versuchte durch eine derartige hypothetische Annahme die regellos erscheinenden Stabilitätsverhältnisse *cis*/*trans*-isomerer Hydrindan-Verbindungen von einem einzigen Standort aus zu erfassen. IR-spektroskopische[18] sowie reaktionskinetische Untersuchungen[19] sprechen jedoch dagegen.

Zur *trans*-Anordnung des 5-Ringes in bezug auf den Zyklohexanring müssen die äquatorialen Bindungen

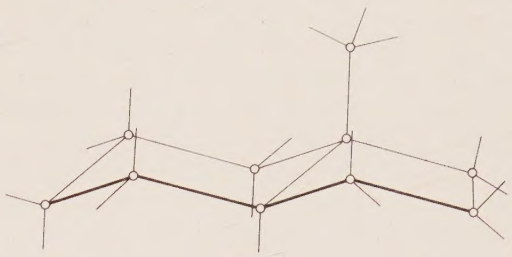


Abb. 5*a*

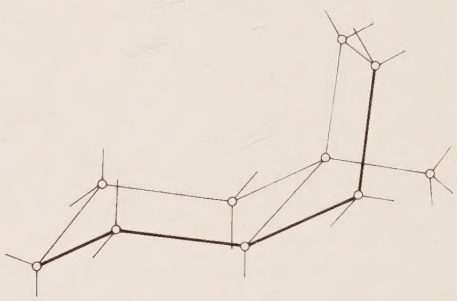


Abb. 5*b*

zweier benachbarter C-Atome einander genähert werden (Abb. 4). Dadurch wird die Sessel-Konstellation noch stärker gewinkelt, und der Abstand der an übernächsten C-Atomen befindlichen axialen Atome verringert sich[15]. Vom 6-Ring aus gesehen bewirkt die *trans*-Verknüpfung eine stärkere Spannungszunahme, und hieraus erklärt sich die geringere Energiedifferenz der Hydrindane im Vergleich zu den Decalinen. Der Einfluss der Verknüpfungsart auf die Geometrie des Zyklopentanringes tritt dagegen zurück.

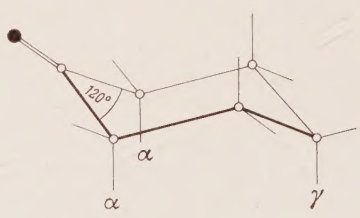


Abb. 6

Da die Einführung einer angularen Methylgruppe auch beim *trans*-8-Methyl-hydrindan (Abb. 5*a*) eine stärkere Erhöhung des «skew»-Charakters nach sich zieht, als es beim *cis*-Produkt (Abb. 5*b*) der Fall ist, muss im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den De-

[11] D. H. R. BARTON, Exper. *6*, 316 (1950).
[12] J. N. HARESNAPE, Chem. and Ind. *1953*, 1091.
[13] W. HÜCKEL, M. SACHS, J. YANTSCHULEWITSCH und F. NERDEL, Ann. *518*, 155 (1935).
[14] W. HÜCKEL, M. SACHS, J. YANTSCHULEWITSCH und F. NERDEL, Ann. *518*, 155 (1935). – W. G. DAUBEN und K. S. PITZER in *Steric Effects in Organic Chemistry* (M. S. Newman, John Wiley & Sons, New York 1956).
[15] S. G. ANGYAL und C. G. MACDONALD, J. chem. Soc. *1952*, 686.
[16] S. G. ANGYAL und C. G. MAC DONALD, J. chem. Soc. *1952*, 686. – R. P. LINSTEAD, Ann. Reports *32*, 306 (1935). – H. G. DREX, Rec. trav. chim. Pays-Bas *41*, 318 (1922). – W. HÜCKEL und H. FRIEDRICH, Lieb. Ann. *451*, 132 (1926). – L. P. KUHN, J. Amer. chem. Soc. *74*, 2492 (1952). – A. S. DREIDING, Chem. and Ind. *1954*, 992. – E. L. ELIEL und C. PILLAR, J. Amer. chem. Soc. *77*, 3600 (1955).
[17] A. S. DREIDING, Chem. and Ind. *1954*, 992.
[18] L. P. KUHN, J. Amer. chem. Soc. *74*, 2492 (1952).
[19] E. L. ELIEL und C. PILLAR, J. Amer. chem. Soc. *77*, 3600 (1955).

calin-Isomeren eine grössere Stabilität des 8-Methyl-*cis*-hydrindans angenommen werden.

Die Anwesenheit eines trigonalen Ring-C-Atoms im Zyklohexanon (Abb. 6) bewirkt eine Spreizung des zugehörigen C–C–C-Valenzwinkels vom Wert des Tetraederwinkels auf 120°. Als Folge davon vergrössert sich der Abstand zwischen den beiden *cis*-axial orientierten α-H-Atomen (von 2,53 auf 3,04 Å), während ihre Entfernung zum *cis*-axial angeordneten γ-H-Atom geringer wird (von 2,53 auf 2,37 Å)[20]. In Übereinstimmung mit dem Zyklohexan weist das 6-Ring-Keton keine Baeyer-Spannung auf, dagegen kommt es zur Ausbildung einer relativ geringen Pitzer-Spannung, indem der ausschliesslich «staggered»-Charakter des Zyklohexans – vor allem durch die beinahe «eclipsed»-Orientierung der Karbonylgruppierung zu den beiden äquatorialen, α-ständigen H-Atomen[21] – etwas abgeschwächt wird.

Die Einführung eines trigonalen C-Atoms in den Zyklopentanring verändert sowohl dessen Baeyer- wie dessen Pitzer-Spannung. Das quantitative Ausmass dieser beiden Effekte ist schwer abzuschätzen, die Gesamtringspannung erniedrigt sich jedoch, da die Anzahl und der Grad energetisch ungünstiger Konstellationen stark beeinflusst wird.

Der Energieunterschied in den Bildungswärmen beim Zyklohexan und Zyklohexanon einerseits, beim Zyklopentan und Zyklopentanon andererseits zeigt, dass mit dem Übergang vom Zyklohexan zum Zyklohexanon eine Zunahme (Abnahme des «staggered»-Charakters), mit dem Austausch einer CH_2-Gruppe durch die C=O-Gruppierung beim 5-Ring eine Abnahme der Ringspannung (Abnahme des «eclipsed»-Charakters) verbunden ist[22].

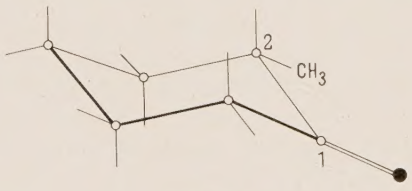


Abb. 7

Bei Anwendung der Turnerschen Methode auf alkylsubstituierte Zyklohexanonverbindungen muss den veränderten Konstellationen Rechnung getragen werden. So erfährt eine α-substituierte Zyklohexanonverbindung bei äquatorialer Anordnung des Substituenten (Abb. 7) gegenüber dem axialen Stereoisomeren eine Energieerhöhung, da die Anordnung der 4gliedrigen Atomkette $O–C_1–C_2–CH_3$ annähernd der energiereichen «eclipsed»-Konstellation des *n*-Butans entspricht. Eine β-substituierte Zyklohexanonverbindung erfährt in ihrem Epimeren mit axialem Substituenten (Abb. 8) eine Stabilisierung, da sich am C_1 kein axial orientiertes H-Atom mehr befindet, das mit dem Substituenten am C_3 in die energetisch ungünstige 1,3-diaxiale, repulsive Wechselwirkung treten würde.

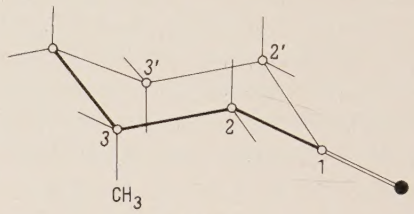


Abb. 8

Diese beiden Konstellationseffekte wurden bei einer sorgfältigen, experimentellen Untersuchung der Stabilitätenreihenfolge einiger Perhydro-1,4-diketo-phenanthrene von ROBINS und WALKER[23] aufgefunden. KLYNE[24] zeigte in einer kürzlich erschienenen, ausgezeichneten Zusammenstellung vieler substituierter

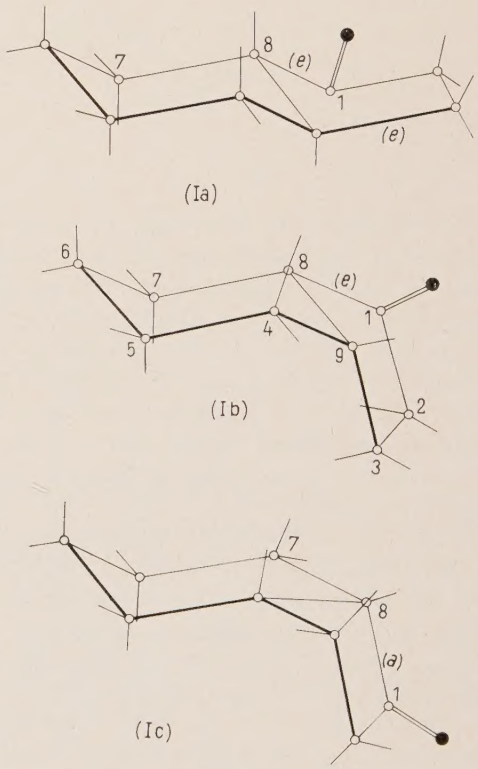


Abb. 9

Zyklohexanonverbindungen die generelle Gültigkeit und nutzbringende Berücksichtigung dieser sogenannten 2-Alkyl- bzw. 3-Alkyl-keton-Effekte. Sie bewirken eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des Energiegehaltes

[20] E. J. COREY und R. A. SNEEN, J. Amer. chem. Soc. *77*, 2505 (1955).
[21] R. C. COOKSON, J. chem. Soc. *1954*, 282.
[22] H. C. BROWN, J. H. BREWSTER und H. SHECHTER, J. Amer. chem. Soc. *76*, 467 (1954).
[23] P. A. ROBINS und J. WALKER, J. chem. Soc. *1954*, 3960; *1955*, 1789; Chem. and Ind. *1955*, 722.
[24] W. KLYNE, Exper. *12*, 119 (1956).
[25] P. A. ROBINS und J. WALKER, J. chem. Soc. *1954*, 3690; *1955*, 1789; Chem. and Ind. *1955*, 772. – W. KLYNE, Exper. *12*, 119 (1956).

Hydrindanon-Verbindung	Effekte: 2-Alkylketon	Effekte: 3-Alkylketon	Stabileres Epimere: theoret.	Stabileres Epimere: experim.	Literatur
Hydrindanon-(1) *trans* (Ia)	$O–C_1–C_8–C_7$	–			
cis(e) (Ib)	–	–	*cis*	*cis*	1, 2
cis(a) (Ic)	$O–C_1–C_8–C_7$	–			
Hydrindanon-(2) *trans* (IIa)	–	–	*trans*	*trans*	3
cis (IIb)	–	–			
Hydrindanon-(4) *trans* (IIIa)	$O–C_4–C_9–C_3$	–			2, 4, 5,
cis(e) (IIIb)	$O–C_4–C_9–C_3$	–			6, 7
cis(a) (IIIc)	–	–	*cis*	*cis*	
Hydrindanon-(5) *trans* (IVa)	–	–			
cis(e) (IVb)	–	–			
cis(a) (IVc)	–	$O–C_5/C_9–C_3$	*cis*		
8-Methylhydrindanon-(1) *trans* (Va)	$O–C_1–C_8–C_7$	–			
cis(e) (Vb)	$O–C_1–C_8–CH_3$	–	*cis*		8
cis(a) (Vc)	$O–C_1–C_8–C_7$	–			
8-Methylhydrindanon-(2) *trans* (VIa)	–	–			
cis (VIb)	–	–	*cis*		
8-Methylhydrindanon-(3) *trans* (VIIa)	$O–C_3–C_9–C_4$	$O–C_3/C_8–CH_3$			
cis(e) (VIIb)	–	$O–C_3/C_8–CH_3$	*cis*		
cis(a) (VIIc)	$O–C_3–C_9–C_4$	–			
8-Methylhydrindanon-(4) *trans* (VIIIa)	$O–C_4–C_9–C_3$	$O–C_4/C_8–CH_3$			
cis(e) (VIIIb)	$O–C_4–C_9–C_3$	–			
cis(a) (VIIIc)	–	$O–C_4/C_8–CH_3$	*cis*		
8-Methylhydrindanon-(6) *trans* (IXa)	–	$O–C_6/C_8–CH_3$			
cis(e) (IXb)	–	$O–C_6/C_8–CH_3$	*cis*		
cis(a) (IXc)	–	$O–C_6/C_8–C_1$			
Vitamin-D-Abbauketon *trans* (Xa)	$O–C_8–C_{14}–C_{15}$	$O–C_8/C_{13}–CH_3$			9, 10
cis(e) (Xb)	$O–C_8–C_{14}–C_{15}$	$O–C_8/C_{13}–C_{17}$			
cis(a) (Xc)	–	$O–C_8/C_{13}–CH_3$	*cis*	*cis*	
15-Ketosteroide *trans* (XIa)	$O–C_{15}–C_{14}–C_8$	$O–C_{15}/C_{13}–CH_3$	*trans*	*trans*	11, 12
cis(a) (XIb)	$O–C_{15}–C_{14}–C_8$	–			
Pyrolithobiliansäure *trans* (XIIIa)	$O–C_3–C_5–C_6$	$O–C_3/C_{10}–CH_3$			13
cis(a) (XIIIb)	$O–C_3–C_5–C_6$	$O–C_3/C_{10}–C_9$	*cis*	*cis*	
8-Methylhydrindan-dion-(1,4) *trans* (XVIa)	$O–C_1–C_8–C_7$ $O–C_4–C_9–C_3$	$O–C_4/C_8–CH_3$ –			
cis (XVIb) ($C_8–C_1 = e$)	$O–C_1–C_8–CH_3$ –	$O–C_4/C_8–CH_3$ –	*cis*		14, 15
cis (XVIc) ($C_8–C_1 = a$)	$O–C_1–C_8–C_7$ $O–C_4–C_9–C_3$	– –			

[1] W. Hückel, M. Sachs, J. Yantschulewitsch und F. Nerdel, Lieb. Ann. *518*, 135 (1935).
[2] R. P. Linstead, Ann. Rep. chem. Soc. *1935*, 305.
[3] W. Hückel und H. Friedrich, Lieb. Ann. *451*, 132 (1926).
[4] W. Hückel und L. Schnitzspahn, Lieb. Ann. *505*, 274 (1933).
[5] W. Hückel und E. Goth, Chem. Ber. *67*, 2104 (1934).
[6] W. Hückel und R. Schlüter, Chem. Ber. *67*, 2107 (1934)
[7] W. Hückel und W. Doll, Lieb. Ann. *526*, 103 (1936).
[8] W. E. Bachmann und A. S. Dreiding, J. Amer. chem. Soc. *72*, 1323 (1950).
[9] A. Windaus und W. Grundmann, Lieb. Ann. *524*, 297 (1936).
[10] K. Dimroth und H. Jonsson, Chem. Ber. *74*, 520 (1941).
[11] C. S. Barnes, D. H. R. Barton und G. F. Laws, Chem. and Ind. *1953*, 616.
[12] D. H. R. Barton und G. F. Laws, J. chem. Soc. *1954*, 52.
[13] A. Windaus, Lieb. Ann. *447*, 233 (1926).
[14] P. K. Banerjee und P. R. Shafer, J. Amer. chem. Soc. *72*, 1931 (1950).
[15] H. H. Inhoffen und E. Prinz, Chem. Ber. *87*, 684 (1954).

einer entsprechenden Zyklohexanonverbindung um rund 1 kcal/Mol[25] und sind weitere Faktoren des empfindlich reagierenden Gleichgewichts von Konstellationskräften. Um eine wenigstens qualitative Aussage über die Stabilitätenreihenfolge der stereoisomeren Hydrindanonverbindungen vorzunehmen, dient das *trans*/*cis*-Isomerenpaar des Hydrindans bzw. dasjenige des 8-Methyl-hydrindans als Bezugssystem, und jeder zusätzlich auftretende Konstellationseffekt wird gesondert berücksichtigt.

Während die jeweilige *trans*-Verbindung eindeutig charakterisiert ist, vermag die Mehrzahl der substituierten *cis*-Hydrindan-Verbindungen wegen ihrer Fähigkeit zur konstellationellen Transformation in zwei ver-

schiedenen, energetisch unterschiedenen Konstellationen aufzutreten[26], die beide betrachtet werden müssen. Bei den Hydrindanon-Verbindungen erfolgt die Unterscheidung der beiden *cis*-Konstellationen durch Anwendung bzw. Erweiterung der von KLYNE[24] bei den Decalon-Verbindungen durchgeführten Kennzeichnung: Die Natur der vom Brücken-C-Atom (äquatorial = *e*; axial = *a*) ausgehenden, der Ketogruppe am nächsten gelegenen Valenz des Zyklohexanringes bestimmt den Namen der jeweiligen Konstellation (siehe Ia–Ic). (Abb. 9). Die folgende Zusammenstellung gibt Auskunft über die zu erwartende Stabilitätenreihenfolge verschiedener Stereoisomerenpaare.

Es wird angenommen, dass die geringfügige energetische Bevorzugung des *trans*-Hydrindans vor seinem Stereoisomeren bereits durch eine destabilisierende 2-Alkylketon-Einwirkung umgekehrt werden kann. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass von den möglichen Hydrindanon-Verbindungen nur das Hydrindanon-(2) (II), in Übereinstimmung mit dem Bezugssystem, in der *trans*-Verknüpfung stabiler ist.

Bei den Verbindungen V bis IX ist jeweils, wie beim 8-Methylhydrindan selber, das *cis*-Isomere das stabilere Produkt.

Für das zu Syntheseversuchen auf dem Steroidgebiet hergestellte 8-Methylhydrindan-dion-(1,4) (XVI)[27] konnte experimentell das Vorliegen der *cis*-Verknüpfung nachgewiesen werden. Wie aus der Tabelle ersichtlich, sprechen konstellationsanalytische Überlegungen für die grössere Stabilität dieses Stereoisomeren.

Die Stereochemie des sog. Vitamin-D_2-Abbauketons (X)[28] (Abb. 10) ist dazu verwendet worden, die Verknüpfungsart der Ringe *C* und *D* in den Steroiden zu bestimmen, indem die Isomerisierbarkeit dieses Ketons, in Verbindung mit der experimentell bestimmten grösseren Stabilität des *cis*-Hydrindanons-(4)[29], als Bestätigung der *trans*-Verknüpfung benutzt wurde[30]. Berücksichtigt man den zur Zeit der aufgezeigten Schlussfolgerung noch nicht bekannten Einfluss einer angularen Methylgruppe auf die Stabilitätenreihenfolge eines Stereoisomerenpaares, so verliert diese Aussage an Beweiskraft. Konstellationsanalytische Betrachtungen der isomeren Abbauketone zeigen nun, dass im *trans*-Produkt die einander entgegengerichteten 2-Alkylketon-(O–C_8–C_{14}–C_{15}) bzw. 3-Alkylketon-Effekte (fehlende repulsive 1,3-Wechselwirkung zwischen der axialen CH_3-Gruppe an C_{13} und einem axialen H-Atom an C_8) wirken. Das *cis*(*e*)-Keton weist den destabilisierenden 2-Alkylketon-Effekt vor, nicht jedoch die *cis*(*a*)-Konstellation, so dass das Abbauketon – wie bisher angenommen – in der *cis*-Verknüpfung stabiler sein sollte. Einen unmittelbaren Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme liefert die Röntgenstrukturanalyse des 4-Jod-5-nitrobenzoats vom Vitamin D_2[31]. Diese Untersuchung zeigt eindeutig die *trans*-Verknüpfung der Ringe *C* und *D* im Vitamin-Molekül und damit auch in der irreversibel isomerisierbaren, durch schonenden Abbau zugänglichen Form des Abbauketons.

Nach Untersuchungen von BARTON und LAWS[32] sind 15-Keto-steroide (XI) (Abb. 11) in der normalen 14-α-Konfiguration energieärmer als ihre Epimeren. ELIEL und PILLAR[19] konstatieren eine stärkere sterische Behinderung zwischen den zwei benachbarten Alkylsubstituenten an C_{13} und C_{17} und sehen hierin die Ursache für die

[26] W. G. DAUBEN und J. JIU, J. Amer. chem. Soc. *76*, 4426 (1954).

[27] P. K. BANERJEE und P. R. SHAFER, J. Amer. chem. Soc. *72*, 1931 (1950). – H. H. INHOFFEN und E. PRINZ, Chem. Ber. *87*, 684 (1954).

[28] A. WINDAUS und W. GRUNDMANN, Lieb. Ann. *524*, 295 (1936). – K. DIMROTH und H. JONSSON, Chem. Ber. *74*, 520 (1941).

[29] W. HÜCKEL und L. SCHNITZSPAHN, Lieb. Ann. *505*, 274 (1933). – W. HÜCKEL und E. GOTH, Chem. Ber. *67*, 2104 (1934). – W. HÜCKEL und R. SCHLÜTER, Chem. Ber. *67*, 2107 (1934).

[30] K. DIMROTH und H. JOHNSSON, Chem. Ber. *74*, 520 (1941).

[31] D. CROWFOOT und J. D. DUNITZ, Nature *162*, 608 (1948).

[32] C. S. BARNES, D. H. R. BARTON und G. F. LAWS, Chem. and Ind. *1953*, 616; D. H. R. BARTON und G. F. LAWS, J. chem. Soc. *1954*, 52.

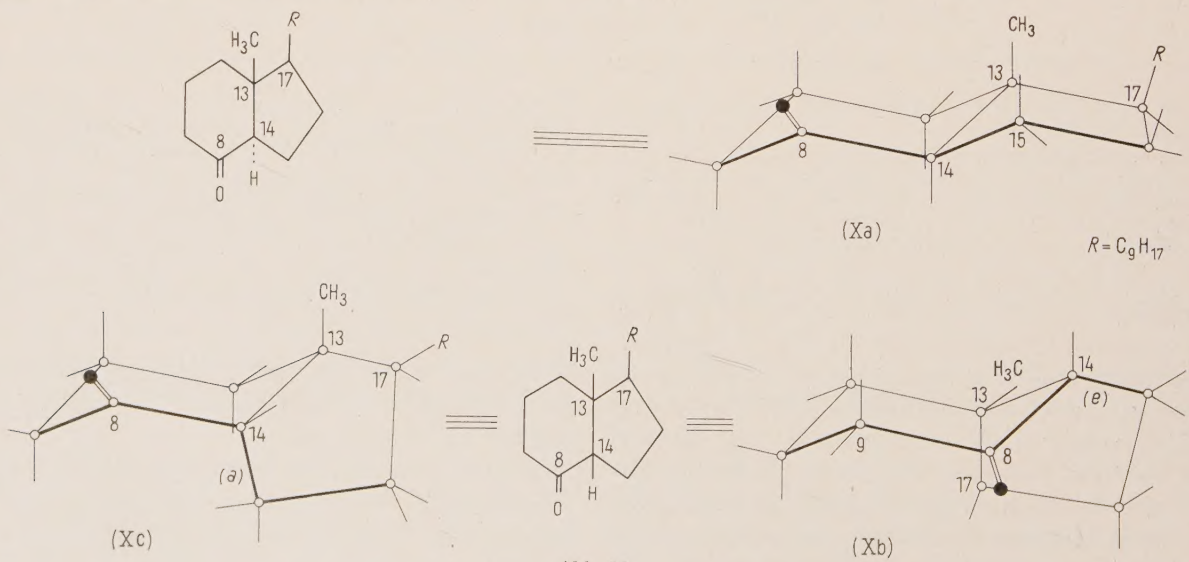


Abb. 10

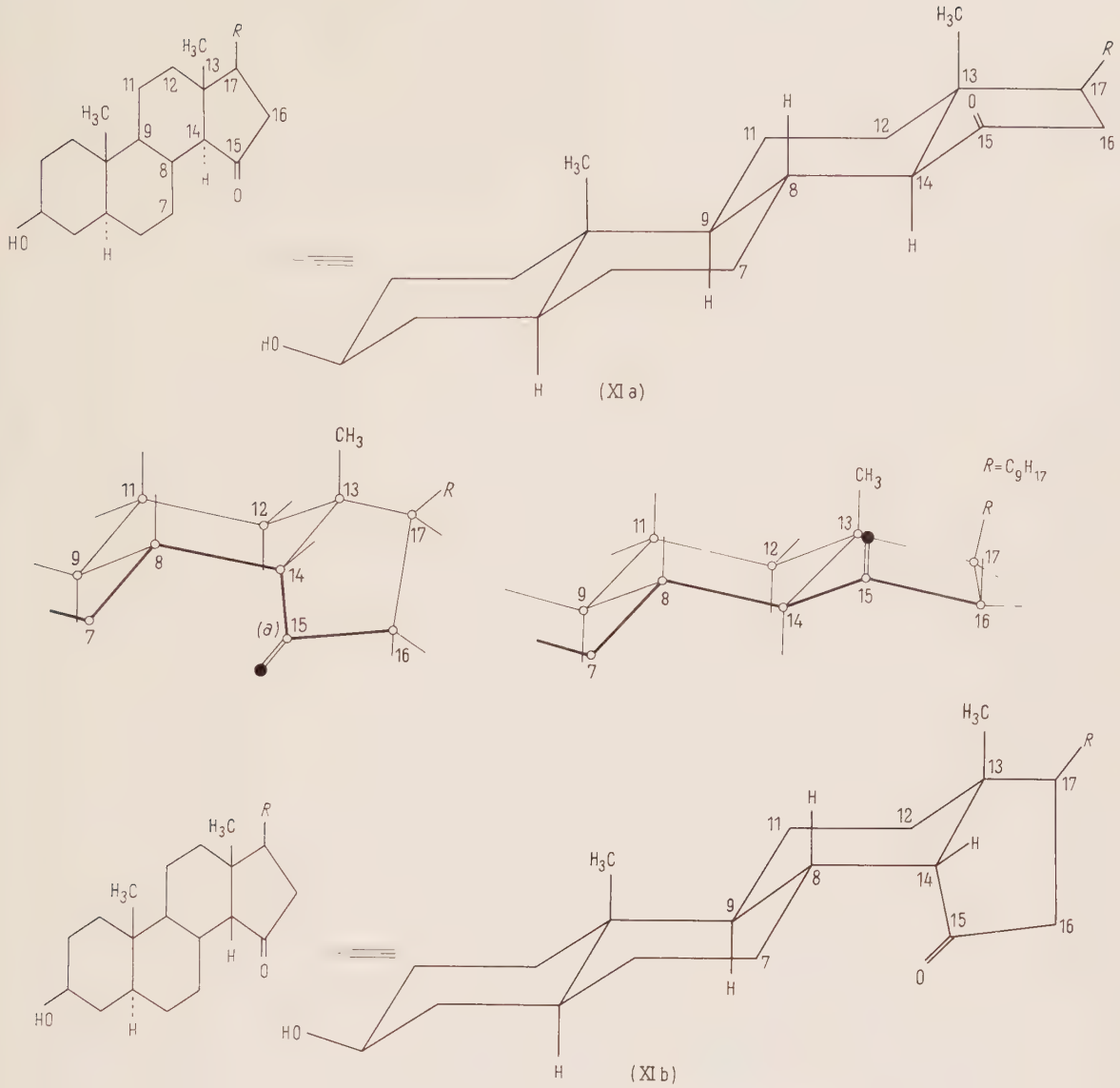


Abb. 11

grössere Stabilität des *trans*-verknüpften Ringsystems. Ein solcher Einfluss kann jedoch nicht entscheidend für die Stabilitätsverhältnisse sein, da er auch im Vitamin-D_2-Abbauketon (X) wirksam sein müsste. Vielmehr führt auch in diesem Fall die Berücksichtigung der Alkylketon-Effekte zu einer Deutung des vorliegenden Tatbestandes. Das *trans*-verknüpfte C_{15}-Keton weist einen 2-Alkylketon-Effekt und darüber hinaus einen eventuell abgeschwächten 3-Alkylketon-Effekt auf. Die *cis*(*a*)-Form des Ketons erfährt durch eine 2-Alkylketon-Wechselwirkung eine Energieerhöhung. Die an sich energetisch bevorzugte *cis*(*e*)-Konstellation braucht in diesem Fall wegen der Starre, das heisst Unfähigkeit zur konstellationellen Transformation, die durch den in 1,2-*trans*-Stellung ankondensierten Ring *B* hervorgerufen wird, nicht berücksichtigt zu werden, so dass die Nichtisomerisierbarkeit der 15-Keto-steroide verständlich wird.

Wie die 15-Keto-steroide entspricht die Pyrolithobiliansäure (XIII)[33] dem Typ des 8-Methyl-hydrindanons-(3). Durch eine umfassende Diskussion der Reaktionen und der Verhaltensweise der epimeren 2,3-Seco-steroid-2,3-disäuren bzw. der epimeren 3,4-Seco-steroid-3,4-disäuren gelangte Windaus[34] zu dem Schluss, dass Lithobiliansäure (XIIa) durch Pyrolyse unmittelbar, allo-Lithobiliansäure (XIIb) dagegen erst nach Epimerisierung an C_5 in die stabilere Pyrolithobiliansäure mit *cis*-verknüpftem (A–Nor/B–)Hydrindanon-System übergeht (Abb. 12). Die Stabilitätsverhältnisse sind also im Fall der Pyrolithobiliansäure genau denen der 15-Keto-steroide entgegengesetzt. Eine konstellationsanalytische Betrachtung der ersteren Verbin-

[33] L. F. Fieser und M. Fieser, *Natural Products Related to Phenanthren* 3. Aufl. (Reinhold, New York 1949), S. 622.
[34] A. Windaus, Lieb. Ann. *447*, 233 (1926).

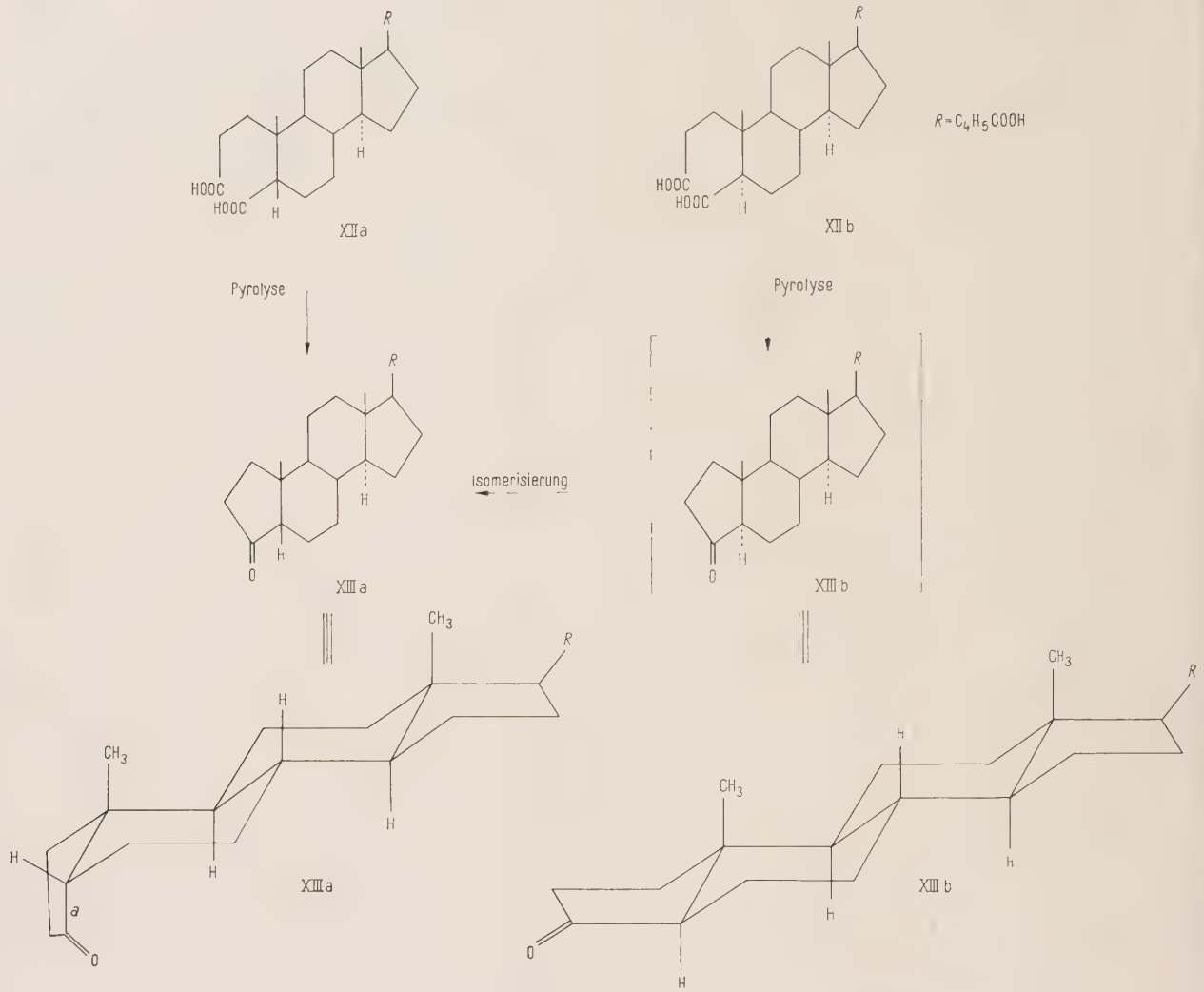


Abb. 12

dung zeigt, dass sowohl beim *trans*- wie beim *cis*-verknüpften Isomeren jeweils eine 2-Alkylketon- und eine (im Fall der *trans*-Verknüpfung eventuell abgeschwächte) 3-Alkylketon-Wechselwirkung vorliegen, so dass der Einfluss der angularen CH_3-Gruppe zugunsten des *cis*-Isomeren den Ausschlag gibt. Auch in diesem Beispiel ist ein Übergang in die *cis*(*e*)-Konstellation unmöglich.

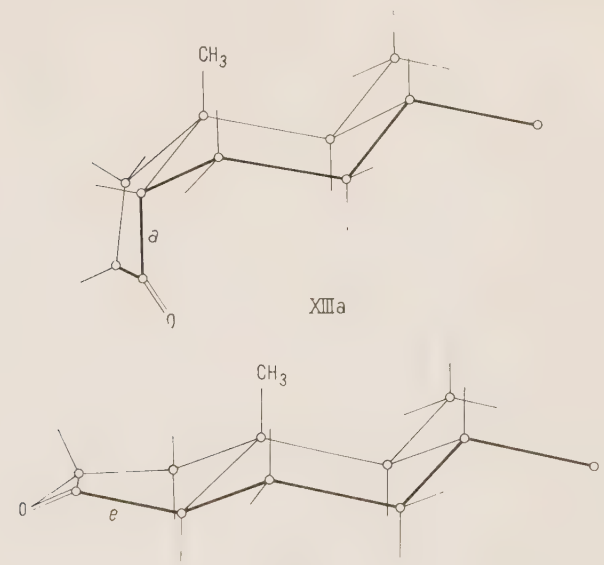


Abb. 13

B-Nor-cholestan[35] (XV) liefert ein Beispiel mit zwei 8-Methyl-hydrindan-Systemen in einem und demselben Molekül. Dieser gesättigte Kohlenwasserstoff ist aus dem Diketon XIV zugänglich; (Abb. 14) und zwar entsteht die sauerstoffreie Verbindung mit Hilfe der Wolff-Kishner-Reduktion aus der über die C_5-Enolform zugänglichen, thermodynamisch stabileren Karbonylverbindung. Gestützt auf die Verallgemeinerung, dass Hydrindan-Verbindungen in der *cis*-Verknüpfung stabiler sein sollen als ihre *trans*-Epimeren, schrieb Fieser[36] dem A/B–Nor-Ringsystem *cis*-Verknüpfung zu, während Dauben und Fonken[37] sich erst kürzlich für das Gegenteil entschieden.

[35] F. Sorm, Coll. Czechoslov. chem. Commun. *12*, 437 (1947). – F. Sorm und H. Dykova, Coll. Czechoslov. chem. Commun. *13*, 407 (1948).

[36] L. F. Fieser, J. Amer. chem. Soc. *75*, 4386 (1953).

[37] W. G. Dauben und C. F. Fonken, J. Amer. chem. Soc. *78*, 4736 (1956).

Abb. 14

Eine konstellationsanalytische Diskussion des B-Nor-cholestans stösst deshalb auf grosse Schwierigkeiten, weil durch die alternierende Kondensation von 5- und 6-Ringen ein neues geometrisches System entsteht. Der Austausch eines Zyklohexanringes im Decalin-System durch einen Zyklopentanring erschwert die Konstellationsanalyse der Hydrindan-Verbindungen. Dies ist in einem weitaus stärkeren Mass beim Übergang vom Steroidmolekül zu dem des B-Nor-cholestans der Fall, da nun die gegenseitige Einwirkung zweier 5-Ringe auf einen mittelständigen 6-Ring (B-Nor/C/D-System) sowie zweier 6-Ringe auf einen dazwischenliegenden 5-Ring (A/B-Nor/C-System) zu berücksichtigen bleibt.

Herrn Prof. Dr. H. H. Inhoffen danke ich für die grosszügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. D. H. R. Barton für die Freundlichkeit der Durchsicht des Manuskriptes.

Summary

The stability orders for several *cis/trans* epimeric hydrindanones and 8-methyl-hydrindanones are shown in a qualitative manner. Starting with the geometry of cyclopentane and cyclohexane changes of Bayer and Pitzer strain existing in the two isomeric bicyclo (4:3:0) nonane systems are discussed. The influences of an angular methyl group (estimated by the simple empirical method evaluated by Turner) and of two new conformational effects (alkyl ketone effects) induced by replacing a methylene group by a carbonyl group are taken into account.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Ein (M, F)-Problem

(Schluss)

In einer früheren Arbeit[1] ist ein Satz für die Teilklasse I (Äquatorradius am Rand) der konvexen Rotationskörper bewiesen worden, der nun in voller Allgemeinheit ausgesprochen werden kann:

Satz: Die einparametrige Schar der geraden Kreiskegel besitzt in der Klasse der konvexen Rotationskörper der festen Länge l bei vorgegebenem M die kleinste Oberfläche F.

Beweis für die Teilklasse II (Äquatorradius nicht am Rand).

Wir betrachten zuerst die Teilklasse II_2. Irgendeinen Kegelstumpfkegel betten wir ein in eine einparametrige Schar, wobei der Anfangskörper ein Kegel, der Endkörper ein unsymmetrischer Doppelkegel ist (Abb. 1).

Die gewählten Bezeichnungen haben den Vorteil, dass die einschlägigen Formeln der oben zitierten Arbeit übernommen werden können[2].

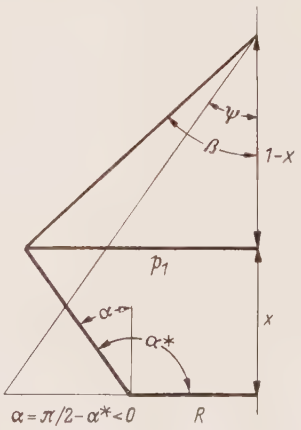


Abb. 1.

[1] H. Bieri, Exper. *12*, 369 (1956).

[2] Die Diskussion von Φ wird, um Platz zu sparen, nicht durchgeführt.

Im Falle $a > 0$ gilt im Intervall $\alpha < \psi < \beta$ wiederum $\Phi > 0$, und die betrachtete Körperschar ist nicht extremal. Dasselbe trifft aber auch für $a \leqq 0$ zu, da die Kegelkurve auch im Intervall $-\pi/2 \leqq \psi \leqq$ *von unten konvex ist*[3].

Wir betten weiter irgendeinen unsymmetrischen Doppelkegelstumpf in eine einparametrige Schar ebensolcher Körper ein (Abb. 2). Der eine Endkörper enthält einen Kegel, der andere gehört zur Klasse I_1; somit

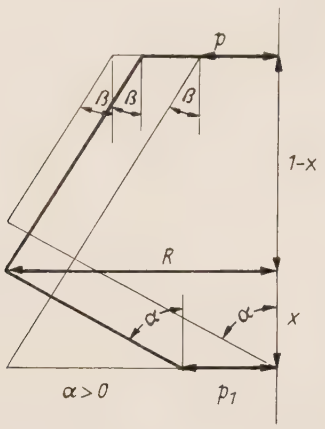


Abb. 2.

sind beide bis auf triviale Spezialfälle nicht extremal. Man berechnet:

$$F = \pi[R^2(\operatorname{cosec}\alpha + \operatorname{cosec}\beta) - p_1^2(\operatorname{cosec}\alpha - 1) - p^2(\operatorname{cosec}\beta - 1)]$$

$$p_1 = \frac{R(\operatorname{cotg}\alpha + \operatorname{cotg}\beta) - 1 - p\operatorname{cotg}\beta}{\operatorname{cotg}\beta}$$

$$F = \pi\,(a \cdot p^2 - 2\,b \cdot p + c) \text{ mit} \qquad (1)$$

$$a = -\frac{\operatorname{cotg}^2\beta\,(\operatorname{cosec}\alpha - 1) + \operatorname{cotg}^2\alpha\,(\operatorname{cosec}\beta - 1)}{\operatorname{cotg}^2\alpha} \leqq 0.$$

Die zugeordnete Bildkurve ist demnach bis auf triviale Spezialfälle *von unten konkav*, was sofort den Schluss gestattet, dass die Doppelkegelstümpfe II_2 nicht extremal sind.

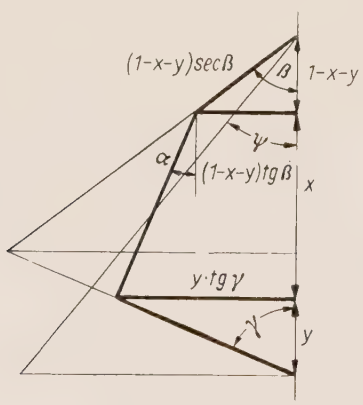


Abb. 3.

Der nächsthöhere Körper von prinzipiellem Interesse ist ein spezieller Körper aus II_3 (Abb. 3).

[3] An dieser Stelle werden erstmals Kurvenstücke benützt, die nicht mehr Bilder von Scharen konvexer Rotationskörper sind.

Unverändert gilt[4]:

$$F = \pi[ax^2 - 2bx + c]$$
$$M = \pi[-dx + e]. \qquad (2)$$

Im Falle $a \leqq 0$ ist die Parabel (2) *von unten konkav*, oder sie entartet in eine Gerade. Die betrachtete Körperschar kann also nicht extremal sein.

Im Falle $a > 0$ stellen wir unserem Körper wieder einen Kegel von gleichem M gegenüber, eliminieren x und erhalten:

$$\boxed{\begin{aligned} d^2(F_1 - F_2) &= \Phi(\psi; \alpha, \beta, \gamma) \\ &\equiv a\,(e-E)^2 - 2bd\,(e-E) + d^2(c-C) \end{aligned}} \qquad (3)$$

Es ist durchaus möglich, die Koeffizienten in (2) explizite zu berechnen. Doch genügen folgende Angaben:

$$b > 0, c > 0, d > 0, e > 0 \text{ für } \beta \neq 0, \gamma \neq 0;$$
$$C = \frac{\sin\psi}{1 - \sin\psi}; \quad E = \operatorname{tg}\psi\,(\pi/2 + \psi), \qquad (4)$$

wie man aus Abbildung 3 mühelos abliest.

Man setzt noch abkürzend:

$$\Phi = a \cdot \Phi_1^2 - 2bd \cdot \Phi_1 + d^2 \cdot \Phi_2;$$
$$\Phi_1 = e - \operatorname{tg}\psi\,(\pi/2 + \psi); \quad \Phi_2 = c - \operatorname{tg}\psi\,(\pi/2 + \psi). \qquad (5)$$

Φ ist für $\psi = \psi_1$ und $\psi = \psi_2$ positiv[5]. Wir zeigen, dass Φ im ganzen Intervall $\psi_1 < \psi < \psi_2$ positiv bleibt. Zu diesem Zwecke betrachten wir die Minorante

$$\Phi = a \cdot \Phi_1^2|_{\psi = \psi_2} - 2bd \cdot \Phi_1 + d^2 \cdot \Phi_2. \qquad (6)$$

Dieselbe ist selbst im ungünstigsten Falle in einer linksseitigen Umgebung von $\psi = \psi_2$ positiv. Sollte die Minorante nicht positiv definit sein, so weist sie für $\psi = \psi^*$ eine Nullstelle auf. Wegen der Monotonität von Φ_1 ist daselbst die neue Minorante

$$\Phi^* = a \cdot \Phi_1^{2*} - 2\,bd \cdot \Phi_1 + d^2 \cdot \Phi_2.$$

So zufahrend, erreicht man offensichtlich das linke Intervallende, was zu beweisen war.

Damit ist aber nachgewiesen, dass die betrachteten Körper nicht extremal sind. Mit $\alpha = 0$ gilt diese Aussage für Körper II_3 mit einem zylindrischen Mittelstück. Auf genau gleiche Weise werden auch alle Körper aus II_4 mit Randkegeln als nicht extremal erkannt.

Damit ist die Menge der individuell zu behandelnden Körper vollständig. Jeden andern Körper erhält man durch Abschleifen ohne Verkleinerung des Äquatorradius[6]. Die Bildkurven der so entstehenden einparametrigen Körperscharen sind durchweg *von unten konkav*, womit der Beweis geleistet ist.

Die Lösung unseres Problems ist bemerkenswert. Im Gegensatz zu vielen andern Extremalproblemen liegt hier eine *einheitliche Schar von Extremalkörpern* vor.

[4] Die folgenden Ausführungen schliessen sich eng an die entsprechenden Ausführungen der unter [1] zitierten Arbeit an.

[5] Weil nämlich die 2 Doppelkegel aus II_2 schon als nicht extremal erkannt worden sind. ψ_1 und ψ_2 sind zwei passende ψ-Werte, die nicht berechnet zu werden brauchen.

[6] Vergleiche hierzu die Abbildungen 2 und 3 der unter [1] zitierten Arbeit. Auch die Deformation der Abbildung 2 (Verschieben des Äquatoriums) ist durchgreifend.

Die geraden Kreiskegel besitzen also bei festem M kleinstes F und ebenso bei festem F grösstes M. Ausserdem weisen sie bei festem F im Intervall $\arcsin(1/3) \leqq \psi \leqq \pi/2$ auch noch kleinstes Volumen V auf[7]. Diese doppelte Extremaleigenschaft wird gestatten, im Hauptproblem der konvexen Rotationskörper einen Fortschritt zu erzielen[8].

H. Bieri

Bern, 24. Mai 1957.

Summary

The proof of the problem which was studied in a former work, was now brought to an end: that among all convex rotatory bodies of the constant lengths l the cones possess the smallest surfaces if M is given.

[7] H. Bieri, Exper. *6*, 223 (1950).

[8] Hierüber wird an anderer Stelle berichtet werden.

The Problem of Solubilization and Precipitation and the Calcium and Phosphorus Cycle in Cavern Formation*

The process of solubilization of insoluble matter such as $Ca_3(PO_4)_2$ and $CaCO_3$ in nature and the transport of the solubilized materials is one of the fundamental problems in biology[1]. The redeposition or precipitation[2] which is concerned with the mechanism of formation of insoluble phosphates is, in a way, the opposite of solubilization. This process is basic for calcification in bone and teeth. The formation of stalagmites and stalactites in caves is another aspect of the same problem and a knowledge of the composition of the deposits should give insight into this mechanism.

We could find no data on stalactite or stalagmite analyses in the literature, including Clarke's *Data on Geochemistry*[3] which appears to be the most comprehensive reference source.

Stalactites and stalagmites are crystalline calcium carbonate. They are formed by waters which have become saturated with calcium bicarbonate by percolating through and partially dissolving the overlaying limestone. Where there are phosphatic formations the waters must carry the solubilized phosphates also, which then would be deposited on the roof or sides of the caverns or grow from the floor. Temperature probably does not affect the processes at this stage to any considerable extent, as nature has made caves natural air conditioners.

Calcium phosphate occurs in nature mostly as tribasic phosphate, especially as apatite, but also as dibasic phosphate e.g., brushite $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ and monetite $CaHPO_4$. Besides apatites, phosphates also occur as deposits of bats guano in caves. Furthermore the shells of giant crustaceans contain about 5 times as much P_2O_5 as those of present-day lobsters[4].

Our analytical results support the following assumptions. By various processes (e.g.[5]) apatite undergoes alterations and is slowly dissolved by percolating waters. A part of the dissolved phosphates is carried away with the waters and later on absorbed in living organisms, a part is retained by the soil and taken up by plants, another part is reprecipitated after the CO_2 has escaped or is deposited in the form of carbonates.

The mechanism for the solubilization process is:

(1) $Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2 + CO_2 = Ca_3(PO_4)_2 + CaCO_3 + H_2O$

(2) $Ca_3(PO_4)_2 + CaCO_3 + 3CO_2 + 3\,H_2O \dashrightarrow 2\,CaHPO_4 + 2\,Ca(HCO_3)_2.$

The final effect is one of transition into more soluble phosphates. Gulick[6] points out that life originated under conditions in which phosphorus was only partially oxidized and that these phosphites and hypophosphites were much more soluble than the completely oxidized forms.

The following mechanism leads to redeposition: If the solution contains an excess of H ions the formation of $PO_4^{\equiv}$ is repressed, in this case the tertiary salt does not separate, since it is soluble in weak acids, even in carbonic acid. (According to Baudisch[7] CO_2 under pressure is an extremely strong acid.) $Ca_3(PO_4)_2$ will be formed from concentrated solutions of $Ca(H_2PO_4)_2$ but not from dilute ones. With a certain excess of phosphoric acid it is possible to obtain $CaHPO_4$ as a solid phase without subsequent conversion into the primary or tertiary salt. As soon as some of the CO_2 escapes or has been deposited as $CaCO_3$ or other carbonates, the precipitation of calcium phosphate can start.

Experimental part. – As outlined in Table II: 14 specimens of different sources were analyzed for their phosphorus and calcium content. Qualitative tests for magnesium and iron were also made.

To avoid extraneous outside accumulations a center piece was cut out in the case of large specimens, whereas the small pieces were used as such. They were crushed and pulverized. Of these powders 0·2 to 0·3 g were used for each digestion. Two determinations of each were made. All acids used in the evaporation procedure were tested for phosphorus. There was no molybdenum blue reaction. All of these end solutions were tested for silicates by means of micrososmic salt $NaNH_4HPO_4$ beads. No SiO_2 was present. The phosphate content was determined quantitatively by the molybdenum blue reaction. We had found 2 methods for determination of phosphorus in presence of Si[8]. The method of Levine was adapted for the determinations as following. Of the powdered specimens 0·2 to 0·3 g were dissolved in 5 ml of 6 N HCl to avoid loss by splashing, in case there remained an undissolved rest the same was dissolved in additional 2 ml concentrated HCl. The weighing tube was rinsed 3 times with 1 ml of 6 N HCl. The HCl solutions were collected in a platinum dish and evaporated to dryness on a steam bath. Thereafter 1 ml concentrated HCl and 1 ml HF were added and evaporated to dryness. This was repeated once. Then it was evaporated with 5 ml concentrated HCl to dryness and thereafter with 2 ml concentrated HCl and 5 ml H_2O. The solution was transferred to an Erlenmeyer flask and 2 ml HBr and 0·5 ml concentrated

* This investigation was supported by a contract of the U. S. Atomic Energy Commission with the New York Medical College.

[1] I. Mandl, A. Grauer, and C. Neuberg, Biochim. biophys. Acta *8*, 654 (1952); *10*, 540 (1953). – I. Mandl and C. Neuberg, Adv. Enzymol. *17*, 135 (1956).

[2] I. S. Forrest, A. Grauer, M. Kreidl, and C. Neuberg, Enzymologia *17*, 97 (1954).

[3] F. W. Clarke, *Data on Geochemistry*, U. S. Geol. Survey Bull. 770, Washington 1924.

[4] W. H. Hudlestons, Quart. J. Geol. Soc. *31*, 376 (1875). – W. C. Wheeler, Prof. Paper U. S. Geolog. Survey No. 124 (1922).

[5] C. Neuberg†, A. Grauer, M. Kreidl, and H. Lowy, Arch. Biochem. Biophys. *70*, 70 (1957).

[6] A. Gulick, Amer. Scientist *43*, 479 (1955).

[7] O. Baudisch, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 993 (1938).

[8] E. Tschopp, Helv. chim. Acta *15*, 793 (1932). – H. Levine, J. J. Rowe, and F. S. Grimaldi, Analyt. Chem. *27*, 258 (1955).

Table I

Stalactite	% Calcium		% Phosphorus		Fe	Mg
Gilley	39·28	38·61	4·105	4·115	neg.	+
Patterson	43·20	43·28	6·392	6·532	+	neg.
Speedwell	40·50	39·98	4·663	4·639	neg.	+
Eagle Rock	40·02	40·68	4·382	4·503	neg.	neg.
Lynn Hollow	40·38	39·88	2·868	2·934	neg.	+
Roberts	39·36	38·98	3·155	3·214	neg.	+
Laurium	39·05	38·77	9·88	9·78	neg.	trace
Angleur	35·59	35·88	0·721	0·729	+	+
Huactuca	39·81	40·01	9·95	9·90	neg.	+
Dubuque	38·79	38·65	9·22	9·15	neg.	+
Shenandoah	43·03	42·82	10·74	10·65	neg.	+
Bisbee	39·24	38·83	0·674	0·675	neg.	+
Carlsbad	25·39	25·08	0·724	0·706	neg.	+
Kentucky	38·58	38·40	0·797	0·791	trace	+

H_2SO_4 were added and it was heated until fumes evolved. After cooling, the solutions were transferred to 100 ml volumetric flasks and the volume was adjusted. The phosphorus determinations were made with a Lumetron Colorimeter, 660 Filter, otherwise as described in the paper of Levine *et al.*[9]. A reagent blank was run with each series. Table I gives the average of determinations of each specimen.

As CaF_2 is highly insoluble calcium was determined separately, 0·2 to 0·3 g each of the different samples were dissolved as above. The HCl solutions were collected in a porcelain dish and evaporated to dryness, the evaporation with 5 ml of concentrated HCl was repeated twice, after which the solution was transferred to a volumetric flask and made up to 100 ml. The calcium was precipitated as oxalate and titrated with 0·01 *N* $KMnO_4$ as described in F. P. Treadwell and W. T. Hall, *Analytical Chemistry*.

Of each specimen 2 separate samples were used and duplicate analyses were made, the averages of 2 determinations of each are in Table I.

Results and discussion.—The physical appearance of the specimens is described in Table II. Table I shows the values obtained for Ca and P, as well as tests for Mg and Fe.

Table II

The Specimens.

(1) Stalactite Gilley Cave, Lee Co. Va.: Cone shaped parts with a sandy colored layer at the outside, the inside is white. The material is hard and brittle.

(2) Stalactite Patterson Cave, Whyte Co. Va.: There is a layer of rust colored sandy matter on the cone shaped and cylindric white formations of about 2 cm lengths which are of vitrous appearance. The material is hard.

(3) Stalactite Speedwell, Whyte Co. Va.: It represents a banded formation. There are sandcolored layers with narrow bands which are whitishgray. The specimen is hard.

(4) Stalactite Eagle Rock, Quarry Cave, Va.: A planchet, which is of white color with vitrous and pearly layers, at the outside there is a sandy colored sedimentation. The specimen is hard.

(5) Stalactite Lynn Hollow, Va.: Paw and cone shaped formations with pisolitic appendages, banded with bands of different width, the layers are whitish and sand colored with small ocher colored lines between the bands, at the outside sand colored, the structure is very clear at the cleavage sections. The specimen is of medium hardness.

(6) Stalactite Roberts Cave, Smyth Co. Va.: A whitish flat slab, which is sand colored in its outer layer, with veined cleavage sections, of medium hardness.

(7) Stalactite Laurium, Greece: Cone shaped formation consisting of oolitic formations (resembling fish roe) of white color, with a light sandy colored outer layer, of pumice like consistence. The specimen is brittle.

(8) Stalactite Angleur, Belgium. A plate with small conelike formations, banded, white with brownish layers, the outside layer is thin and sandcolored. The structure is very clear at the cleavage sections. The specimen is hard.

(9) Stalactite, Huactuca Mts. Sonora, Mexico. Cylindric, conelike pisolitic formations on a plate, white, banded, with pearly and vitrous layers and a thin sand colored outside layer. The specimen is hard.

(10) Stalactite, Dubuque, Iowa. Small cone shaped and pisolitic formations, pearly white, with a light greyish thin outside layer, at the base there is a thin sandcolored layer. The specimen is hard.

(11) Stalactite, Grottos of the Shenandoah, Va. Cone shaped formations with narrow offshoots, arranged in concentric layers, the center is light ocher colored; there are alternating pearly white and light ocher colored layers and a thin greyish coating at the outside. The specimen is hard.

(12) Stalactite Bisbee, Arizona. Cylindric piece, whitish of medium hardness.

(13) Formative material (fractions of stalactites and stalagmites) from the Big Room of the Carlsbad Caverns, Carlsbad, New Mexico. White cylinders and cones with a light greyish coating at the outside. The material is hard.

(14) Cave Onyx from the Howes Valley, Western Hardin Co., Kentucky. Cone shaped formations, light yellowish and light ocher colored layers, vitreous appearance, the specimen is medium hard.

P values vary from 0·6–0·8% for Angleur, Bisbee, Carlsbad and Kentucky, whereas values for other specimens are as high as 9·2–10·7%. At the same time Ca values with the exception of the formative material from the Carlsbad Cavern (25·08%) are all around 40%. We must assume that the higher P content is due to phosphatic formations whereas specimens with less than 1% seem to derive their P from solubilization, migration and redeposition in cave formations in accordance with the late Prof. Neuberg's hypothesis. This study was made to test this assumption as planned by Prof. Neuberg, who unfortunately was not longer able to carry out the experiments or to interpret the results.

[9] H. Levine, J. J. Rowe, and F. S. Grimaldi, Analyt. Chem. *27*, 258 (1955).

Acknowledgement. Specimens: Gilley, Patterson, Speedwell, Eagle Rock, Lynn Hollow, Roberts Cave were kindly supplied by William McGill, State Geologist, Div. of Geology, Dept. of Conservation and Development, Commonwealth of Virginia, Charlottesville, Va. Specimens: Laurium, Angleur, Huactuca, Dubuque, Shenandoah, Bisbee, by Brian H. Mason, Curator, Geology and Mineralogy, the American Museum of Natural History, New York 24, N. Y. Specimen Carlsbad by R. Taylor Hoskins, Superintendent, Carlsbad Caverns Natl. Park, Carlsbad, New Mexico, and Kentucky by Preston McGrain, Assistant State Geologist Kentucky Geological Survey, University of Kentucky, Lexington, Kentucky.

Thanks are due to Dr. I. S. Kleiner, Director, Dept. of Biochemistry, N. Y. Medical College for his kind support in these investigations.

C. Neuberg† and Amélie Grauer

New York Medical College, New York, May 28, 1957.

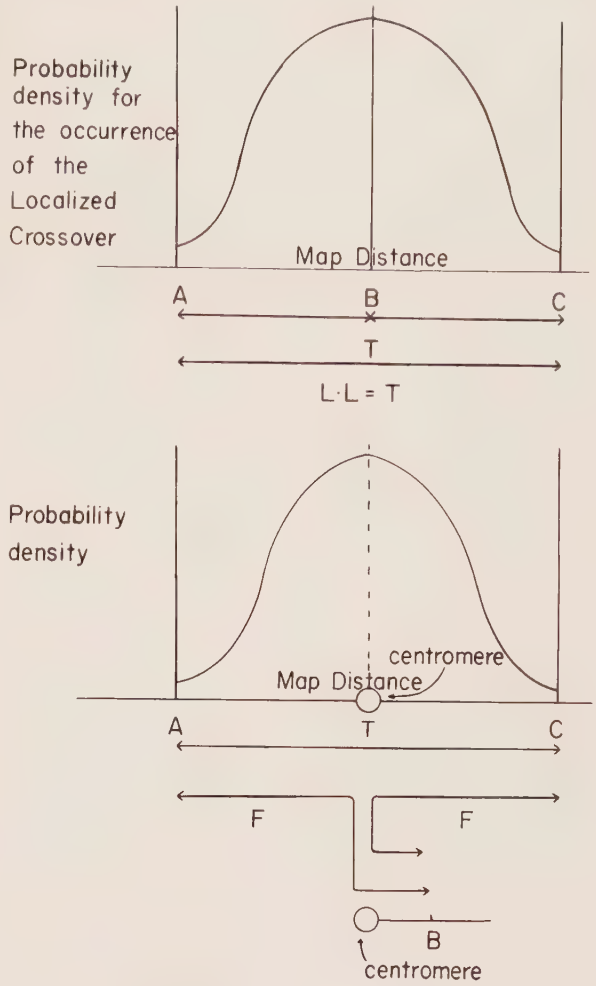
Zusammenfassung

Die Reaktionsmechanismen des Kalziumphosphat-Kreislaufs bei der Auflösung, Wanderung und Wiederabscheidung in Stalaktiten werden erörtert und eine Modifikation der kolorimetrischen Molybdänblaureaktion für kleine Mengen P in Gegenwart von Si beschrieben.

The Localized Crossover and a New Hypothesis of Chromosomal Interference*

Tetrad analysis of *Neurospora* and yeast indicate that a crossover in one region appears to facilitate crossingover in an adjacent region, in direct opposition to the widely accepted view (originating from single strand analysis of *Drosophila* by Muller[1] and Sturtevant[2]) that a crossover occurring in a given region tends to minimize the probability that another will occur in the immediate vicinity. On the demonstration of locally specific chromatid interference in *Neurospora*[3] it was proposed that the low coincidence values in *Drosophila* could be explained by an excess of 4-strand double exchanges[4]. A simpler explanation is now available by the demonstration of localized crossingover in *Saccharomyces*.

The first report[5] of the localized crossover suggested that its occurrence was restricted to a relatively narrow region and no evidence was found at that time to indicate that the localized crossover was not confined to one specific place. Recent evidence indicate that the 'localized' crossover may extend over a region involving several identifiable *loci*[6]. This observation is critical since



(*a*) A diagram representing two regions over which a localized crossover is distributed. When it occurs between *A* and *B*, it does not occur between *B* and *C*, thus producing the fallacious appearance of mutually interfering pairs of exchanges. The marker pairs *A* and *B* and *B* and *C* will exhibit *L*-distributions (although the frequency of tetratype tetrads will not be less than 50%) whereas the distal pair of markers, *A* and *C* will exhibit the *T*-distribution characteristic of a localized exchange. Thus the relation between tetrad distributions for the triplet *A–B–C* is $L \cdot L = T$.— (*b*) The relation $F \cdot F = T$ would be produced where the centromeres of these two chromosomes segregate at random at the first division.

* This work has been supported by a research grant from the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service C-2140.

[1] H. J. Muller, Amer. Nat. *50*, 193, 284, 350, 421 (1916).

[2] A. H. Sturtevant, Z. I. A. V. *13*, 234 (1915).

[3] C. C. Lindegren and G. Lindegren, Genetics *27*, 1 (1942).

[4] E. E. Shult and C. C. Lindegren, Nature *175*, 507 (1955).

[5] E. E. Shult, C. C. Lindegren, and G. Lindegren, Genetica (in press).

[6] Localized crossovers produce *T*-distributions[7] (tetrad distributions with a frequency of tetratype tetrads in significant excess of $^2/_3$) and occur in conjunction with crossovers which are distributed in a Poisson manner, the latter tending to randomize the intensity of the *T*-distribution. [In this connection the term 'randomize' means to cause a distribution to be nearer (deviate less from) the *N*-distribution, $^1/_6$ I + $^1/_6$ II + $^2/_3$ III.] Additive chromosome maps have been obtained from *T*-distributions by means of a mapping function which measures this degree of randomization and solves for the Poisson mean as a metric. *T*-distributions are common in the tetrad analyses of *Saccharomyces* (they cannot be detected in single strand analysis), indicating that localized crossovers are prevalent among these chromosomes. If a chromosomal region in which a localized crossover occurs is appended to a region in which only Poisson-distributed crossovers occur, the distal pairs of markers bounding the total composite region also exhibit a *T*-distribution which is not as extreme as the original *T*-distribution of the sub-region since the effect of the latter is now randomized by a larger average number of Poisson distributed crossovers. This relationship is written $T \cdot L = T$, where the left-hand symbols refer to the tetrad-distribution type of the two sub-regions, and the right-hand symbol refers to the distribution type of the total region. The relations $T \cdot F = T$ and $T \cdot R = T$ also hold[7] on the hypothesis that recombination occurs independently in both sub-regions. The relation $L \cdot L = T$ (or $F \cdot F = T$) would not be predicted on this basis. In fact the high frequency of tetratype tetrads for the total region can occur only because, when one region is type III, the other region is type I or type II, that is, the apparent occurrence of chromosomal interference. Since the total region exhibits a *T*-distribution this must be interpreted as a localized crossover distributed over two regions as is illustrated in the Figure.

it opens up the possibility that the localized crossover, in distinction to the Poisson distributed crossovers, may be effected by the mechanism proposed by Sax[8], suggesting that the localized crossover may occur *after* a chiasma has been initiated resulting from strand tension at the crossing point of the chiasma. On this hypothesis visible chiasmata are assumed to represent crossing points which originated by crossingover (à la Darlington[9]) and were not resolved by crossingover (à la Sax). Delayed crossingover occurring at these points might be expected to be unequal while crossovers occurring just as the chiasma begins to move might be equal. Thus the fundamentals of both Darlington's and Sax's hypotheses may obtain simultaneously, the former explaining the Poisson distributed exchanges and the latter explaining the localized exchanges which resolve entanglements (resulting from Poisson distributed exchanges) that tend to accumulate in specific regions.

The localized crossover, spanning a definite but restricted region, accounts for the phenomenon interpreted as chromosomal interference. If we define two regions by the genes *A*, *B* and *C* (Fig. 1*a*) then, when the localized exchange occurs between *A* and *B*, it does not occur between *B* and *C* and *vice versa*. Under these circumstances the low frequency of concomitant recombination for the two regions results not from mutually interfering *pairs* of exchanges (as was originally assumed by Muller and Sturtevant), but rather as a logical necessity which follows from the spatial placement of a single event. It is important to point out that if crossingover occurs at the time and place proposed by Darlington there is no physical reason why one exchange should inhibit the occurrence of another as was assumed in the original hypothesis of chromosomal interference. This present view does not encounter this difficulty. Thus, the discovery of the localized crossover (by tetrad analysis) provides a hypothesis explaining low coincidence in terms consistent with the occurrence of the negative chromosomal interference encountered in tetrad analysis and with the fact that localized crossovers cannot be detected by the classical (single strand) method on which the hypothesis of chromosomal interference was formulated originally. The present hypothesis makes it possible to generalize the concept of chromosomal behavior from *Ascomycetes* to *Drosophila* since it is not inconsistent with the high frequency of 2-strand double exchanges nor the negative chromosomal interference found in *Neurospora* which would have predicted high coincidence values in *Drosophila*.

E. E. Shult and C. C. Lindegren

Biological Research Laboratory, Southern Illinois University, Carbondale (Ill.), May 14, 1957.

Zusammenfassung

Die bei *Drosophila* beobachtete Herabsetzung der Häufigkeit von Doppelaustausch innerhalb von benachbarten Chromosomenabschnitten lässt sich nicht nur durch die klassische Annahme einer gegenseitigen Interferenz zwischen benachbarten crossing-overs erklären, sondern kann auch durch das Vorkommen von lokalisierten crossing-overs innerhalb von bestimmten, engbegrenzten Chromosomenregionen bedingt sein.

[7] E. E. Shult and C. C. Lindegren, Genetica *28*, 165 (1956).
[8] K. Sax, J. Arnold Arboretum *11*, 193 (1930).
[9] C. D. Darlington, J. Genetics *31*, 185 (1935).

A Mendelian Gene for Albinism in Natural Cave Fish

As previously reported (Şadoğlu[1]), the *Characinid Astyanax*, a normal eyed and dark pigmented fish which lives in overground waters, can be crossed with the pigmentless or ± feebly pigmented blind cave fish *Anoptichthys* which is accepted to be its descendant or close relative. The F_1 hybrids are fertile. *Anoptichthys* is found in different populations which were described as different species and which are genotypically different from one another. In the F_2 generations of both Sabinos and Chica cave fish with normal river fish, recombination of the genes which are responsible for pigmentation and those for eye structure, is observed on a polygenic basis. The number of degenerative genes found in the Sabinos population which lives in the inner part of the cave system, are greater in number than those observed in the Chica population which is located nearer the overground river, Rio Tampaon. The Pachon population found at the innermost cave has even more degenerative genes than the Sabinos fish. The Pachon cave fish used as a grandparent to produce a F_2 generation was captured in nature some years ago. It carried, besides many other genes for pigment reduction, a gene which in homozygous condition prevents pigment formation even in the eyes. The F_2 generation, which results from the cross between Pachon and the overground river fish resulted in 26% (278) albinotic individuals having unpigmented, red eyes of the most different degrees of development from practically none to ± normal. The body of these albino fish is completely pigmentless. The remaining 74% (787) of the F_2 individuals have dark eye pigment even when their eyes are of the most rudimentary type. The body colour of these non-albinotic individuals shows a series of gradations between the body colour of normally pigmented individuals and that typical for cave fish, the pigmentation of which has been much reduced. Thus, in these 74%, the number of polymeric genes present in each of the F_2 fishes controls the degree of melanophore formation. On the other hand, in the albinotic individuals the formation of pigment does not take place, because of the presence of an epistatic inhibitory gene pair. It is very interesting to note that such a great mutational step causing the extinction of all the melanine which up to now is known only in domesticated fish (*Salmo irideus, Xiphophorus helleri, Mollienisia 'sphenops', Dermogenys pusillus et al.*), could be found in cave fishes under absolutely natural conditions.

P. Şadoğlu

Zoological Institute, University of Istanbul, June 6, 1957.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass beim Höhlenfisch *Anoptichthys* – neben zahlreichen anderen degenerativen Genen – ein Gen für Albinismus vorkommt.

[1] P. Şadoğlu, Copeia *1956*, 113.

Morphological Effects of the Secretion of Histamine and Mucopolysaccharides by Mast Cells

Recent studies have proved that granula of mast cells contain histamine as well as heparin. RILEY[1] states that the quantity of tissue-histamine corresponds to the number of mast cells in the tissue or organ concerned. The application of substances liberating histamine results in an extensive degranulation of mast cells[2]. For this reason, degranulation of mast cells is generally considered as a cytological phenomenon connected with the liberation of histamine[3].

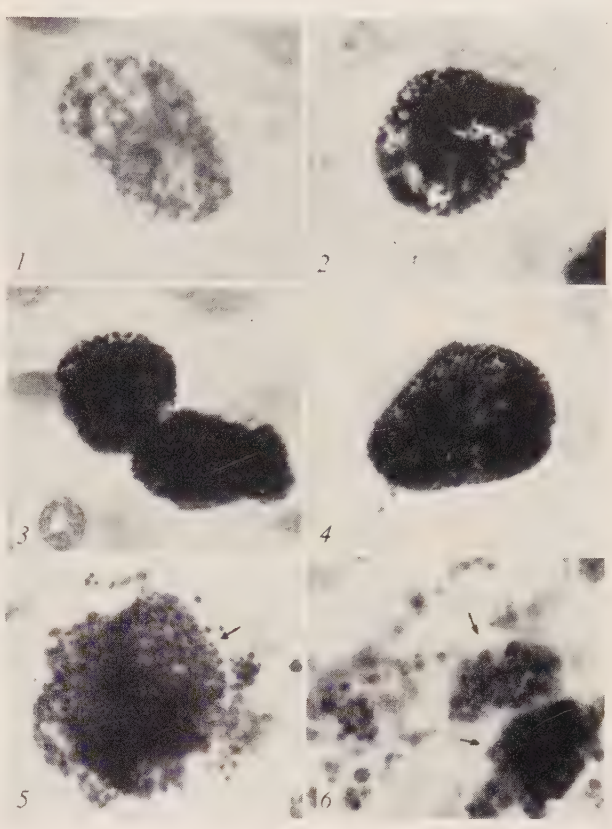
Preliminary experiments, in which we studied the effect of non-specific stress on the cytology of mast cells, made us realize that degranulation is a secondary process which does not commence before the histamine phase has been completed. This fact led us to a revision of the present views on cytological changes coexisting with the secretion of histamine. The results of this revision, which include certain facts concerning ASBOE-HANSEN's[4] views about the relationship of mast cells to mucopolysaccharides of the ground substance, are presented in this report.

The liberation of histamine from the mast cells of the mesentery of rats was achieved by intraperitoneal injection of sterile redistilled water at body temperature, at the rate of 10 ml/100 g of weight. According to FAWCETT[5] and KELLER and BURKARD[6], such interference produces the secretion of a great quantity of histamine into the peritoneal fluid resulting from the disintegration of mast cells. In the control experiment, Tyrode's solution was similarly applied. Specimens of mesenteries were prepared in the following manner. The mesenteries were carefully stretched on glass slides, fixed in methanol for 30 min and stained in 0·01% alcoholic solution of toluidine blue[7]. If necessary, a water solution of toluidine blue of the same degree of concentration was also used, in a 0·1 *M* citrate buffer of pH 4·15, whereupon the metachromatic changes were fixed in ammonium molybdate[8].

Within 5 min after the intraperitoneal injection of redistilled water, symptoms of a severe shock became noticeable: loss of reactiveness to outside stimuli, accelerated surface breathing, motor slowing down. Injection of Tyrode's solution did not result in shock.

Mast cells of the mesentery did not react on the injection of distilled water by osmotic disintegration, but by a change in staining the granules. Immediately after the injection, the granules lose their pronounced dark-violet metachromatical stain, swell, and become less refractive. Many of them display a gradual decolorization which is particularly noticeable in specimens stained in an aqueous solution of toluidine blue (Fig. 1). In the course of the decolorization, the metachromasia of these granules loses its alcohol-resistance. Spots in the cytoplasm of mast cells, where the granules have completely lost their ability of metachromatic staining, make the impression of vacuoles. Hereafter we shall refer to them as to pseudovacuoles. The remaining granules retain their original affinity to toluidine blue, but they are smaller. Their swelling soon abates. Frequently they join and form pedicles and thus border the pseudovacuoles. After these transformations mast cells acquire a somewhat honeycomb structure (Fig. 2).

Cytoplasm condenses about 5 min after the injection so that the pseudovacuoles, i.e. gaps originating from group decolorization of granules, disappear. The whole



Mast cells of the rat mesenteries after intraperitoneal injection of redistilled water. Toluidine blue staining. × 1300.

Fig. 1. – Immediately after injection. Group decolorization of granules in the course of the formation of honeycomb structure (water solution of toluidine blue).

Fig. 2. – 2 min after injection. The honeycomb structure of the mast cell. In cytoplasm there are partly gaps (pseudovacuoles), partly original granulation, no longer displaying signs of swelling.

Fig. 3. – 5 min after injection. The honeycomb structures disappear, cell diminish in size.

Fig. 4. – 15 min after injection. Some granules stain full red, the rest dark-violet. Spots where the red staining granules are deposited appear lighter in the microphotograph.

Fig. 5. – 90 min after injection. In cytoplasm partly a densely accumulated original dark-violet granulation may be seen (in the lower portion of the cell), and partly a lighter, full red granulation (↗). The red granulation is being expelled from the cell.

Fig. 6. – 4 h after injection. Group of macrophages (↗) in whose cytoplasm there is a phagocytized granulation of dark-violet stain. The surrounding area is flooded with swollen expelled granules which stain faintly and are not phagocytized.

[1] J. F. RILEY and G. B. WEST, J. Physiol. *120*, 528 (1953).
[2] J. F. RILEY, J. Path. Bacteriol. *65*, 471 (1953). – D. W. FAWCETT, J. exper. Med. *100*, 217 (1954).
[3] J. F. RILEY, Blood *9*, 1123 (1954).
[4] G. ASBOE-HANSEN, Ann. Rheumatic Dis. *9*, 149 (1950).
[5] D. W. FAWCETT, J. exper. Med. *100*, 217 (1954).
[6] R. KELLER and W. BURKARD, Helv. physiol. Acta *14*, 289 (1956).
[7] H. KRAMER and G. M. WINDRUM, J. Histochem. Cytochem. *3*, 227 (1955).
[8] L. LISON, Acta histochem. *2*, 47 (1956).

body of the cell is again evenly filled with fine granulation (Fig. 3). The size of these restituted cells is on the whole smaller than before commencement of the experiment.

In the succeeding intervals, we could see another, quite different cytological process. It consists in an intracellular change of stainability of the granules, the latter being finally separated from the cytoplasm of the mast cells. The changes of the stainability are in this case different from the above-mentioned decolorization. The deep dark-violet metachromatic tone turns full red. This means that granules do not lose their metachromatic character, but there is only a certain change in their staining properties and/or basophilia, resulting in the reduction of the affinity to toluidine blue. The full red granules at first appear singly here and there (15 min) (Fig. 4), but gradually outnumber the original granulation. At certain stages (30–90 min) mast cells contain two kinds of granules (Fig. 5). In the end, all the dark-violet granules turn full red. In the course of these intracellular changes, the full red granules are being gradually expelled into intercellular spaces. Disintegration of mast cells does not take place before all the granules have succumbed to the above-mentioned changes of stainability (1–2 h); prior to this the granules are just being expelled without disintegration of the cells. The extracellular granules thereupon lose their stainability and regular form; they swell, turn amorphous, and disappear. The ground substance in places abounding particularly in free granules stains metachromatically. During the degranulation, however, some of the granules with unchanged stainability are also expelled. These granules are phagocytized and accumulate as coarse aggregates in the cytoplasm of macrophages. On the other hand, the red granules are not phagocytized (Fig. 6).

The control rats that received Tyrode's solution were not shocked. Even in these cases, we could notice in short intervals after the injection (10 min) single honeycomb mast cells. The degree of changes in single cells and the number of cells reacting in this manner are incomparably smaller than after the injection of the redistilled water. Elimination of the granules from the cytoplasm does not take place.

Coagulativeness of blood remained on the whole normal in the course of the experiment.

Discussion.—From the report we may conclude that an injection of redistilled water causes in the mast cells two independent successive processes: first a group decolorization of granules resulting in the formation of honeycomb structures, and secondly an intracellular change of the stainability of granules and their expulsion from the bodies of the cells. Immediately after the injection, i.e. at the stage of shock, the honeycomb structures are formed. A curve denoting the histamine content in peritoneal fluid, as shown by Keller and Burkard[6], reaches its maximum at this time. It is therefore the honeycomb structure of mast cells that is related to the liberation of histamine, and not degranulation, as authors have hitherto assumed[9]. The degranulation take place after the disappearing of the honeycomb structure. At this time, the signs of the shock, i.e. histamine phase, cease. According to Werle and Amann[10], histamine is bound up with the heparin component of granula. Considering the fact that the formation of a honeycomb structure is the result of decolorization of granula, we may assume that the liberation of histamine depends on the intracellular depolymerization of the heparin component of the granules.

The honeycomb structure of the histamine phase was followed by the degranulation of mast cells. Prior to degranulation, the mast cells were restituted *ad normam*. Degranulation cannot be looked upon as a mere osmotic disintegration; it appears to be an active expulsion of the granules. According to Wegelius and Asboe-Hansen[11], the stimulus of such expulsion is most likely the increasing quantity of water in the ground substance of the connective tissue. The intracellular change of stainability of granules may be due to the loss of the sulphate groups of heparin, with regard to the reduced affinity of granules to toluidine blue and to the preserved metachromatic qualities at the same time. The assumed difference in the biochemical constitution of the metachromatic component of the original granules and the altered ones is proved not only by the staining properties but also by their affinity to the macrophages: the original heparin containing granules are phagocytized, while the altered full red ones are not. Normal coagulativeness of blood persists throughout the whole experiment, in spite of a complete degranulation of mast cells, as was pointed out also by others[12]; this is another proof that the granules of the mast cells in this case do not expel heparin but mucopolysaccharide of the hyaluronate type, which is derived from the former. On the basis of the above-mentioned facts, we may conclude that the degranulation of mast cells after intraperitoneal injection of redistilled water is essentially an expression of the secretion of mucopolysaccharide of the hyaluronate type into the ground substance of connective tissue mediated by the expelled granules. This mucopolysaccharide originates through an intracellular process from the heparin component of the granules.

M. Hill

Histologic-Embryological Institute of the Faculty of Medicine, University of Brno (Czechoslovakia), May 21, 1957.

Zusammenfassung

Das morphologische Bild der Sekretion des Histamins und der Mukopolysaccharide vom Hyaluronattypus wird in den Mastzellen festgestellt. Die Histaminsekretion äussert sich im Verlust der metachromatischen Eigenschaften mancher Mastzellgranula und in der dadurch auftretenden Wabenstruktur der Mastzellen selbst, während die Sekretion der Mukopolysaccharide durch die intrazelluläre Änderung der Färbbarkeit der Granula und ihre darauffolgende Ausschüttung aus dem Zytoplasma der Mastzellen charakterisiert ist.

[9] J. F. Riley, J. Path. Bacteriol. *65*, 471 (1953). – D. W. Fawcett, J. exper. Med. *100*, 217 (1954). – R. Keller and W. Burkard, Helv. physiol. Acta *14*, 289 (1956). – I. Mota, W. T. Beraldo, and L. C. U. Junqueira, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *83*, 455 (1953).

[10] E. Werle and R. Amann, Klin. Wschr. *34*, 624 (1956).

[11] O. Wegelius and G. Asboe-Hansen, Exp. Cell Res. *11*, 437 (1956).

[12] I. Mota, W. T. Beraldo, and L. C. U. Junqueira, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *83*, 455 (1953). – R. Keller, Arch. int. Pharmacodyn. *107*, 382 (1956).

Ultrafiltration Measurement of Paraprotein Particles in Four Cases of Macroglobulinemia

Blood proteins of patients suffering from macroglobulinemia Waldenström[1] show, on electrophoretic examination, a homogeneous additional paraprotein fraction, containing macroglobulins. Up to the present time, very little is known about the form and dimensions of macroglobulin particles. In one case, Gard, Heller, and Malmros[2] found by direct observation in an electronic microscope that macroglobulins in a fixed preparation show practically spherical particles with diameters ranging approximately from 120 to 180 Å. In another case, Weber and Hässig[3] proved—by means of sedimentation, diffusion and viscosity measurements—the existence of barlike particles of macroglobulins.

We considered it necessary to state the dimensions of native, non-fixed paraprotein particles in macroglobulinemia. For this purpose we chose a new combination of methods: the ultrafiltration of macroglobulin sera through graded collodion membranes in connection with successive paper electrophoretic examination of filtrates. All methodical data were published elsewhere[4]. We emphasize here that from the theory of ultrafiltration[5] it is clear that by this method it is possible to find out just one diameter of the particles measured: this is the shortest diameter, regardless whether their shape be spherical, barlike etc. Therefore the shape of particles cannot be determined by the ultrafiltration alone.

For our study we had at our disposal suitable sera of four patients with macroglobulinemia Waldenström, containing distinct, electrophoretically homogeneous paraproteinemic fractions. Detailed clinical and laboratory statements would exceed the range of this brief report. As agregates of macroglobulins originated by precipitation with distilled water cannot be fully returned into the state of isolated particles with physiological saline, which we proved ourselves[6], we carried out filtration of the whole native sera and not of the isolated macroglobulin fraction.

Average porosities of membranes used are mentioned in the Table; their thickness varied from 180 to 400 μ. Through membranes of individual porosities we filtered, on the average, 4·5 ml of the native undiluted serum; the usual filtration area was 8 cm^2. When applying a gradually increasing filtration pressure from 0·1 to 1·5 atm., the filtration lasted at least 15 h. Individual filtrates after being concentrated by dialysis were submitted to paper electrophoresis. Electrophoregrams of ultrafiltrates were evaluated visually as for the presence of the paraproteinemic fraction. All ultrafiltration experiments rendered clear results which are summarized in the table.

We used Elford's[5] formula to deduce the diameter of measured particles (p) from the value of the porosity of the limiting membrane (d):

$$p = F \cdot d$$

The values of the correcting factor (F) were interpolated according to the statements of the same author. In the last column of the table, the possible extents of the diameters of paraprotein particles in singular cases are given—taking into account the accuracy of ultrafiltration measurements. It is evident that the shortest diameters of native paraprotein particles in all four cases of macroglobulinemia are very similar or nearly the same, moving in the range of 140–220 Å. The relative shifting of the filtration end-point—and subsequently of the diameter of the particles—in case No. 2 was most probably due to the low density of the macroglobulin fraction in this case. It is possible to suppose that, if adsorption on the collodion membrane is taken into account, the contents of paraproteins in the filtrate of lower porosity (46 mμ) decreased under the level necessary to be provable electrophoretically.

It may be mentioned here that in five simultaneously investigated sera of plasmocellular myeloma the filtration end-point of analogous paraproteinemic particles lay between 11–20 mμ[6]. This corresponds to the diameter of particles of only 30–70 Å, i.e. to the range of the shorter diameters of the majority of normal serum fractions –38 Å.

J. Šmarda and D. Wiedermann

Departments of General Biology and Experimental Pathology, Medical Faculty, Masaryk University, Brno (Czechoslovakia), June 7, 1957.

Zusammenfassung

Durch die Ultrafiltrationsmessung der im nativen Zustande im Serum sich befindlichen Paraproteine von vier Makroglobulinämiekranken konnte der kleinere Durchmesser der Teilchen bei 140–220 Å bestimmt werden. Der gleiche Diameter bei gleichzeitig untersuchten Myelom-Paraproteinen beträgt jedoch nur 30–70 Å.

[1] J. Waldenström, Schweiz. med. Wschr. *78*, 927 (1948).
[2] S. Gard, L. Heller, and H. Malmros, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *79*, 328 (1952).
[3] R. Weber and A. Hässig, Schweiz. med. Wschr. *85*, 910 (1955).
[4] D. Wiedermann and J. Šmarda, Schweiz. med. Wschr. *86*, 930 (1956).
[5] W. J. Elford, Trans. Faraday Soc. *33*, 1094 (1937).
[6] D. Wiedermann, J. Šmarda, and B. Wiedermann, Z. ges. exper. Med. (in press).

Table

Case No.	Average porosity in mμ												Filtration end-point (mμ)	Elford's factor F	Diameter of particles (mμ)
	60	54	51	49	47	46	40	39	35	34	22	17			
1			+			+	–	–			–	–	40	0·42	16–20
2	+		+	+		–	–			–			46	0·43	18–22
3					+			–		–			39	0·42	14–21
4		+				+	–		–	–			40	0·42	16–20

+ presence of paraprotein fraction in the filtrate
– absence of paraprotein fraction in the filtrate

Swelling Properties of the Mitochondria of Unfertilized and Newly Fertilized Sea Urchin Eggs

Recent work from this laboratory[1] has given evidence of changes in the activity of some mitochondrial enzymes taking place in conjunction with fertilization of the sea urchin egg. It appeared of interest to investigate whether these were accompanied by changes in the physiological, and hence structural, conditions of the mitochondrial membrane. In fact, the structure of the membrane can no doubt influence the exchanges between the mitochondria and the surrounding cytoplasm.

For this analysis, advantage has been taken of the recent findings on the permeability of the mitochondria and of the factors which influence it[2].

Mitochondria from unfertilized and newly fertilized eggs (5–10 min after fertilization) of *Paracentrotus lividus* were prepared as previously described[3]. They were suspended in 0·5 *M* Tris (hydroxymethyl) aminometane buffer at pH 7·4. From this suspension 0·2 ml aliquots were diluted with 3·0 ml of sucrose at different concentrations from 0·5 to 0·1 *M* and in buffer only. Readings of the optical density at 520 mμ were taken immediately after mixing and then at 5 or 10 min intervals, up to 30 min.

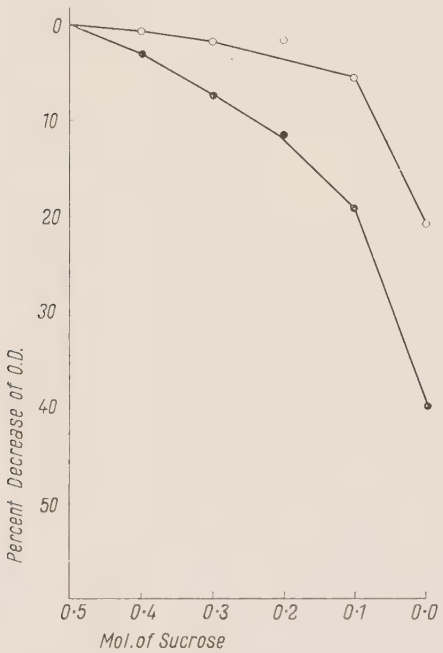


Fig. 1. — Swelling of mitochondria of unfertilized (•——•) and newly fertilized (○——○) eggs of *Paracentrotus lividus* in varying concentrations of sucrose and in Tris buffer. Swelling is expressed as per cent decrease of the optical density (*O.D.*) at 520 mμ with respect to the value in 0·5 *M* sucrose, after 10 min.

The results of one such experiment are reported in Figure 1. They show that the swelling of the mitochondria in a hypotonic medium is considerably greater in those prepared from unfertilized eggs than in those prepared from newly fertilized eggs.

It has been found recently[4] that the most sensitive test to distinguish between mitochondria from tumor and from normal cells is the greater sensitivity of the former to low concentrations of trypsin (0·0046%). Anionic detergents on the contrary are much less effective on tumor mitochondria than on those of normal cells.

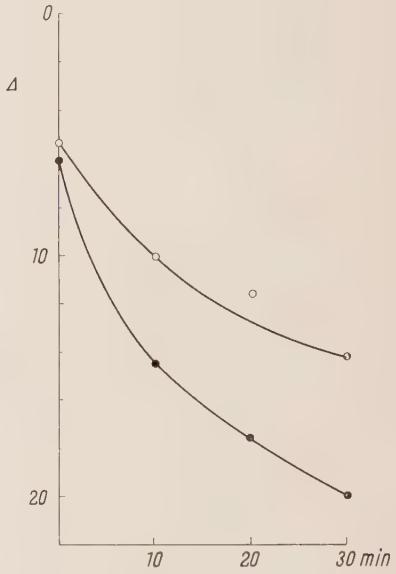


Fig. 2. — Effect of a 0·003% (final concentration) solution of Duponol B on the swelling of mitochondria of unfertilized (•——•) and newly fertilized (○——○) eggs of *Paracentrotus lividus*. The points on the diagram are the difference (Δ) between the per cent decrease of the *O.D.* of the mitochondria suspension in the presence of Duponol and of the control without Duponol.

Mitochondria from unfertilized and newly fertilized eggs are entirely insensitive to the same concentration of trypsin. Detergents, on the other hand, increase considerably the swelling of the mitochondria which, again, is much greater in the case of those prepared from unfertilized eggs (Fig. 2).

These findings give evidence of some structural change taking place in the membrane of the mitochondria of the sea urchin egg upon fertilization.

It seems interesting to recall here that unfertilized eggs of *Paracentrotus* are very sensitive to the cytoloyzing effect of taurocholate but become almost insensitive to it during the first 2 min after fertilization[5]. It is tempting to visualize a common process which brings about the cortical changes *and* the changes of the mitochondrial membrane upon fertilization.

This investigation has been supported by a Grant from Consiglio Nazionale delle Ricerche.

A. Monroy

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), June 22, 1957.

[1] A. Monroy, J. cell. comp. Physiol. (in press). – R. Maggio, J. cell. comp. Physiol. (in press).

[2] K. W. Cleland, Nature *170*, 497 (1952). – J. Raaflaub, Helv. physiol. pharmacol. Acta *11*, 142 (1953). – D. F. Tapley, J. biol. Chem. *122*, 325 (1956). – R. F. Witter and M. A. Cottone, Biochim. biophys. Acta *22*, 364 (1956). – C. A. Price, A. Fonnesu, and R. E. Davies, Biochem. J. *64*, 754 (1956).

[3] A. Monroy, J. cell. comp. Physiol. (in press).

[4] V. Mutolo and F. Abbrignani (in preparation).

[5] A. Monroy, Pubbl. Staz. zool. Napoli *25*, 188 (1954).

Riassunto

Mitocondri isolati da uova vergini e appena fecondate di *Paracentrotus lividus* sono stati trattati con soluzioni di saccarosio a concentrazioni decrescenti, a partire da 0,5 *M*, e con Duponol. Si è trovato che nelle soluzioni ipotoniche il rigonfiamento dei mitocondri è notevolmente maggiore per quelli preparati da uova vergini che per quelli preparati da uova fecondate. Anche al trattamento con Duponol sono più sensibili i mitocondri delle uova vergini.

Zur Biochemie des Gewächshaustabaks

Im Gewächshaus gezogene Tabakpflanzen weichen morphologisch stets vom Freilandtabak der gleichen Rasse erheblich ab. Besonders auffallend ist dies bei der Schweizer Sorte *Mont Calme brun*, deren sich entwickelnde Spitzenblätter im Freien pelzig behaart sind, während vergleichbare gleich hoch inserierte Blätter im Gewächshaus nur vereinzelte Haare tragen[1] und dadurch einen juvenilen Eindruck machen. Ferner sieht der Freilandtabak, verglichen mit Gewächshauspflanzen, stets etwas gedrungener aus, weil er grössere Blätter bildet; dadurch scheinen die Internodien relativ kürzer zu sein. Trotz optimaler Temperatur, Befeuchtung und Belüftung sowie zusätzlicher Belichtung[2] gelingt es nicht, diese Verschiedenheit völlig zum Verschwinden zu bringen, auch wenn der Gewächshaus- und der Freilandtabak in genau gleicher Erde stocken.

Der Unterschied bezieht sich indessen nicht nur auf die äussere Morphologie, sondern auch auf den Blattchemismus. Dies äussert sich bei der Aufarbeitung der geernteten Blätter, indem Gewächshaustabak wohl schön vergilbt, jedoch nur unvollkommen oder überhaupt nicht verbräunt, selbst wenn er von normalerweise sich stark bräunenden Rassen stammt. Hieraus folgt, dass in Gewächshausblättern entweder das bräunende Fermentsystem oder dann das zugehörige Substrat in ungenügender Menge entwickelt wird. Künzli[3] wies nach, dass eine mangelhafte Substratbildung vorliegt. Ähnlich wie in Freilandblättern der gelben Sorte *Mont Calme jaune*, werden Blatthomogenate bei Zusatz von Catechol braun, so dass also die notwendigen Polyphenolasen vorhanden sind.

Eine nähere Charakterisierung des Verbräunungssystems ergibt, dass als Fermente eine Polyphenoloxydase vom Typus der Laccase, die also Monophenole wie das Tyrosin nicht zu oxydieren vermag[4], und eine Peroxydase vorliegen, während als Substrate Chlorogensäure (Depsid der Kaffeesäure mit Chinasäure) und Rutin (Glukorhamnosid des Quercetins) auftreten[5]. Im Gewächshaustabak fehlt nun das Glukosid Rutin vollständig und die Chlorogensäure wird in unzureichendem Masse erzeugt. Ähnliche Feststellungen wurden gleichzeitig auch von Dawson und Wada[6] gemacht; ferner fanden diese Autoren, dass die papierchromatographisch erfassbare Chlorogensäuremenge bei Freilandtabak von der Tageslänge abhängt.

Dies bestätigt die Vermutung, dass die Belichtung im Gewächshaus den Minimumfaktor vorstellt, der die Substratbildung beschränkt. Weil die Steigerung der Lichtmenge (Intensität × Belichtungsdauer) im Gewächshaus nicht viel ändert, wurde geprüft, ob vielleicht die Lichtqualität ein massgebender Faktor für die Substratbildung sei. Da die ultraviolette Strahlung im Gewächshaus durch die Verglasung wegfiltriert wird, unternahmen wir orientierende Versuche mit einer zusätzlichen UV-Bestrahlung. Zuerst erhielten die Gewächshauspflanzen dreimal täglich während 30 min eine Zusatzbelichtung mit einer Quecksilberdampflampe. In einer weiteren Versuchsserie wurde die Bestrahlungszeit auf 8 h je Tag ausgedehnt.

Es scheint also erwiesen zu sein, dass kurzwelliges Licht die Bildung dieses Depsides zu stimulieren vermag.

Abb. 1. Links mit UV bestrahlte, rechts unbestrahlte Pflanze der Sorte *Mont Calme brun*, im Gewächshaus gezogen.

Trotz dieser Massnahme blieb die Rutinbildung völlig aus. Dagegen gelang es, die Menge der Chlorogensäure erheblich zu steigern, wie folgende Analysenzahlen zeigen (je zehntes Blatt der Rasse *Mont Calme brun*).

	Freiland	Gewächshaus ohne UV	Gewächshaus mit 1½ h UV/Tag	Gewächshaus mit 8 h UV/Tag
Chlorogensäure	2,72 %	0,41 %	1,72 %	2,52 %

Bei achtstündiger Belichtung mit UV trat neben diesen chemischen Veränderungen ein auffallender Unterschied des Phänotypus im Vergleich zu unbestrahlten Pflanzen auf. Die mit UV belichteten Pflanzen wuchsen schneller und bildeten viel grössere Blätter aus als die unbestrahlten Pflanzen (Abb. 1 und 2). Aber nicht nur die Grösse, sondern auch die Beschaffenheit der Blätter ist verschie-

[1] E. Eichenberger, Diss. ETH. Zürich *1952*, S. 124.
[2] P. Waltz, Diss. ETH. Zürich *1957*.
[3] S. Künzli, Diplomarbeit ETH. Zürich *1952* (unveröffentlicht).
[4] M. Shiroya, T. Shiroya und S. Hatteri, Physiol. Plantarum *8*, 594 (1955).
[5] S. Bäbler, Diss. ETH. Zürich (im Druck).
[6] R. F. Dawson und E. Wada, Tobacco *144*, 18 (1957).

den: Während die unbestrahlten Blätter sehr fein und durchscheinend sind, sehen die bestrahlten kräftig grün aus und sind viel dicker. Der unter Glas mit ultravio-

Abb. 2. Links 10. Blatt der mit UV bestrahlten, rechts 10. Blatt der unbestrahlten Pflanze.

lettem Licht bestrahlte Tabak steht somit in seiner Erscheinungsform dem Freilandtabak viel näher als den üblichen Gewächshaustabaken.

A. Frey-Wyssling und S. Bäbler

Institut für Allgemeine Botanik, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, 25. Juni 1957.

Summary

Tobacco, cultivated under glass, does not produce any rutin and only about a seventh of the normal amount of chlorogenic acid. UV-treatment increases the formation of chlorogenic acid up to the normal level, while the synthesis of rutin cannot be stimulated. In addition there is a conspicuous morphogenetic influence in the UV-treated plants.

Synthese basisch substituierter, analgetisch wirksamer Benzimidazol-Derivate[1]

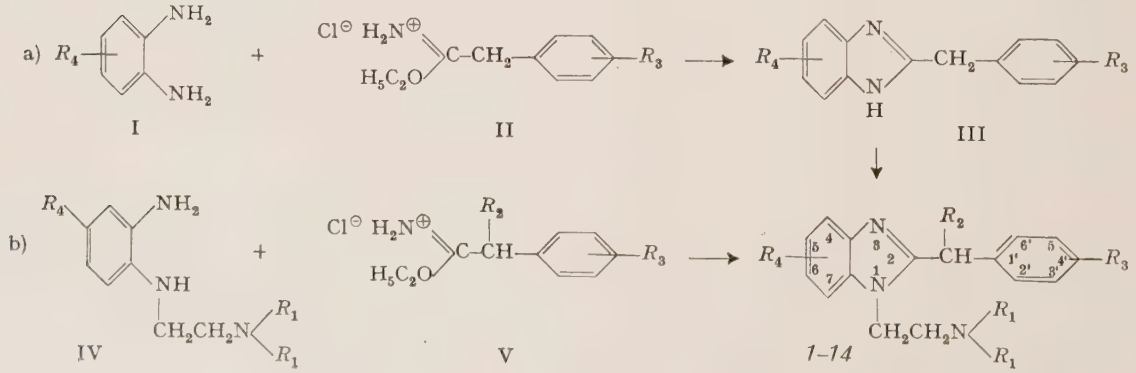
Im Verlaufe unserer synthetischen Arbeiten stellten wir schon vor einigen Jahren 1-(β-Diäthylamino-äthyl)-2-benzyl-benzimidazol *(1)* her, für das eine gewisse analgetische Wirksamkeit gefunden wurde. Bei Abwandlung und Einführung weiterer Substituenten liess sich nun überraschenderweise durch eine zusätzliche Nitrogruppe in 5-Stellung des Benzimidazolkerns eine entscheidende Verstärkung der analgetischen Aktivität erzielen. Besonders markant war dieser Effekt, wenn auch in den Benzylrest weitere Substituenten, wie Halogen-, Alkyl- oder Alkoxygruppen, eingeführt wurden, wie aus der nachstehenden Mitteilung zu entnehmen ist[2].

Für die Synthese solcher Benzimidazol-Derivate haben sich vor allem die beiden Wege *a*) und *b*) bewährt (s. Formeln).

o-Phenylendiamin I (R_4= H) lässt sich durch Reaktion mit dem Iminoäther-hydrochlorid der Phenylessigsäure II (R_3 = H) in Dioxan oder Chloroform bei Temperaturen unter 50° in sehr schonender Weise in 2-Benzyl-benzimidazol III ($R_3 = R_4$ = H) überführen[3]. Sofern III im Benzimidazolkern keine weiteren Substituenten mehr aufweist (R_4 = H), oder wenn dieser in 4,7- oder 5,6-Stellung zwei gleiche Substituenten besitzt, kann bei der Alkylierung mit Chloräthyldiäthylamin in Gegenwart von $NaNH_2$ nur ein Produkt der Strukturen *1–14* entstehen. Geht man dagegen von einem 2-Benzyl-benzimidazol aus, das im Benzimidazolkern nur einen zusätzlichen Substituenten aufweist, so erhält man ein Gemisch zweier Isomeren. Solche asymmetrisch substituierte Benzimidazole werden also in beiden möglichen tautomeren Formen alkyliert. So erhält man zum Beispiel aus 2-Benzyl-5(6)-nitro-benzimidazol III (R_3 = H, R_4 = 5[6]-NO_2) auf diese Weise zwei isomere, basisch alkylierte Produkte nebeneinander. Aus dem Gemisch lässt sich eine Base *A* mit Smp. 96–98°, λ_{max} = 310 mμ (ε = 12000) und λ_{max} = 240 mμ (ε = 17700) und eine Base *B* mit Smp. 87–89°, λ_{max} = 310 mμ (ε = 10200) und λ_{max} = 242 mμ (ε = 28000) isolieren.

Andererseits kann durch Umsetzung von 2,4-Dinitrochlor-benzol mit β-Diäthylamino-äthylamin zum N-(β-Diäthylamino-äthyl)-2,4-dinitroanilin, partielle Reduktion mit Ammoniumsulfid zu IV ($R_1 = C_2H_5$, $R_4 = NO_2$)[4] und Kondensation mit V ($R_2 = R_3$ = H) auf eindeutigem Wege 1-(β-Diäthylamino-äthyl)-2-benzyl-5-nitro-

[1] Auszugsweise vorgetragen am XVI. Internationalen Kongress für reine und angewandte Chemie vom 18. bis 24. Juli 1957 in Paris.
[2] F. Gross und H. Turrian, Exper. *13*, 401 (1957).
[3] Vgl. F. E. King und R. M. Acheson, J. chem. Soc. *1949*, 1396.
[4] H. Hippchen, Ber. chem. Ges. *80*, 263 (1947).



Verbindung No.	R_1	R_2	R_3	R_4	Summenformel	Smp.[5] °C
1	$-C_2H_5$	–H	–H	–H	$C_{20}H_{25}N_3 \cdot HCl$	184–186
2	$-C_2H_5$	–H	–4′–Cl	–H	$C_{20}H_{24}N_3Cl$	77–78
3	$-CH_3$	–H	–4′–Cl	–H	$C_{18}H_{20}N_3Cl$	103–104
4	$-C_2H_5$	$-CONH_2$	–4′–Cl	$-5-NO_2$	$C_{21}H_{24}N_5O_3Cl$	161–163
5	$-C_2H_5$	–H	–H	$-5-NO_2$	$C_{20}H_{24}N_4O_2$	87–89
6	$-C_2H_5$	–H	–H	$-6-NO_2$	$C_{20}H_{24}N_4O_2$	96–98
7	$-CH_3$	–H	–4′–Cl	$-5-NO_2$	$C_{18}H_{19}N_4O_2Cl \cdot HCl$	230–232
8	$-C_2H_5$	–H	–4′–Cl	$-5-NO_2$	$C_{20}H_{23}N_4O_2Cl$	75–76
9	$-C_2H_5$	–H	–4′–Cl	$-6-NO_2$	$C_{20}H_{23}N_4O_2Cl$	96–98
10	$-C_2H_5$	–H	$-3'-OCH_3$	$-5-NO_2$	$C_{21}H_{26}N_4O_3 \cdot HCl$	186–189
11	$-C_2H_5$	–H	$-3',4'-(OCH_3)_2$	$-5-NO_2$	$C_{22}H_{28}N_4O_4 \cdot HCl$	193–194
12	$-C_2H_5$	–H	$-4'-CH_3$	$-5-NO_2$	$C_{21}H_{26}N_4O_2 \cdot HCl$	216–218
13	$-C_2H_5$	–H	$-4'-OCH_3$	$-5-NO_2$	$C_{21}H_{26}N_4O_3 \cdot HCl$	197–199
14	$-C_2H_5$	–H	$-4'-OC_2H_5$	$-5-NO_2$	$C_{22}H_{28}N_4O_3 \cdot HCl$	162–164

[5] Schmelzpunkte der freien Basen oder der Hydrochloride, wie aus der Summenformel hervorgeht.

benzimidazol (*5*) synthetisiert werden. Diese Verbindung erweist sich als identisch mit der Base *B* aus der Alkylierung von III ($R_3 = H$, $R_4 = 5[6]\text{-}NO_2$). Damit ist für die Base A die Formel des 6-Nitro-Derivates (*6*) und für Base *B* diejenige der 5-Nitro-Verbindung (*5*) sichergestellt.

In der Tabelle ist eine kleine Auswahl der hergestellten Verbindungen aufgeführt. Für die Synthese von Derivaten ohne Substituenten im Phenylenteil des Benzimidazolkernes (*1*, *2*, *3*) eignet sich der Weg *a*), für 5-Nitro-Verbindungen der Weg *b*). Für 6-Nitro-Derivate muss via *a*) verfahren und aus dem erhaltenen Isomerengemisch das 6-Nitro-benzimidazol-Derivat mit geeigneten Methoden daraus isoliert werden. Über Struktur und Einheitlichkeit des isolierten Isomeren gibt das Verhältnis der Extinktionen der UV.-Maxima bei 240 mμ und bei 310 mμ Auskunft. Für 6-Nitro-Derivate ist das Verhältnis von etwa 1,47, für 5-Nitro-Verbindungen dagegen der viel höhere Wert von etwa 2,80 typisch. Das Amid *4* wird auf dem Weg *b*) durch Reaktion von IV ($R_1 = C_2H_5$, $R_1 = NO_2$) mit dem aus *p*-Chlor-phenylcyanacetamid zugänglichen Iminoäther V ($R_2 = CONH_2$, $R_3 = Cl$) erhalten.

Die Mehrzahl der bis heute bekannten stark wirksamen Analgetika besitzen noch typische Strukturelemente des Morphinmoleküls. Ihre pharmakologische Wirksamkeit ist damit in Zusammenhang gebracht worden[6]. Sogar beim strukturell bereits weiter entfernten Methadon diskutieren einige Autoren noch eine gewisse stereochemische Verwandtschaft[7]. Im Gegensatz dazu lassen sich von der neugefundenen Serie der 1-(β-Dialkylamino-äthyl)-2-benzyl-5-nitro-benzimidazole kaum mehr Parallelen zum Morphin konstruieren.

A. Hunger, J. Kebrle, A. Rossi, und K. Hoffmann

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 26. August 1957.

Summary

The syntheses of 1-(β-dialkylamino-ethyl)-2-benzyl-5-nitro-benzimidazoles, a new series of powerful analgesics, are described.

[6] O. Schaumann, Arch. exp. Path. Pharmak. *196*, 109 (1940).

[7] Vgl. zum Beispiel die zusammenfassende Darstellung von J. Lee in C. M. Suter, *Medicinal Chemistry* (John Wiley & Sons, Inc., New York 1951), Vol. I, p. 438.

Über Benzimidazolderivate mit starker analgetischer Wirkung

Benzimidazol und verschiedene seiner Derivate besitzen spezifische Wirkungen auf das Zentralnervensystem und führen zu einer Beeinträchtigung der intraspinalen Erregungsübertragung, als deren Folge Lähmungen der Skelettmuskulatur auftreten (Goodman *et al.*[1], Berger[2], Domino *et al.*[3]). Anders substituierte Verbindungen haben konvulsive Eigenschaften gezeigt (Domino *et al.*[3]). Dagegen sind bisher keine Benzimidazole mit ausgesprochener analgetischer Wirkung beschrieben worden. Bei der pharmakologischen Untersuchung basisch substituierter Benzimidazole fanden wir neuerdings Verbindungen, die nicht nur qualitativ dem Morphin und ähnlich wirkenden synthetischen Substanzen nahestehen, sondern von denen einzelne die wirksamsten bisher bekannten Analgetika in quantitativer Hinsicht übertreffen. Die Chemie dieser von Hoffmann und Mitarbeitern synthetisierten Verbindungen ist in der voranstehenden Mitteilung beschrieben[4].

Die analgetische Wirkung auf Wärmereiz wurde mit der von uns angegebenen Methode an der Maus untersucht (Gross[5]). Weiterhin wurde an der Ratte die Reaktion auf Druckschmerz quantitativ bestimmt (Green und Young[6]) und am Kaninchen die Aufhebung der durch Kneifen am Ohr hervorgerufenen Abwehrreaktion. Als Vergleichssubstanz diente Morphin. Aus den in Tabelle I zusammengestellten Werten geht hervor, dass Substitution mit einer Nitrogruppe in Stellung 5 zu einer erheblichen Steigerung der analgetischen Wirkung führt, während dies bei Substitution in 6-Stellung nicht der Fall ist (Verbindung Nr. *6* und *9*). Derivate mit der Diaethylaminogruppe an der basischen Seitenkette wirken im allgemeinen stärker als die entsprechenden Dimethylaminoverbindungen). Eine weitere Verstärkung der Analgesie ist auch durch Einführung einer Methoxy- oder Äthoxygruppe in para-Stellung des Benzylrestes zu

[1] L. Goodman, A. Gilman und N. Hart, Fed. Proc. *2*, 80 (1943).

[2] F. M. Berger, Pharmacol. Rev. *1*, 234 (1949).

[3] E. F. Domino, K. R. Unna und J. Kerwin, J. Pharmacol. exp. Ther. *105*, 486 (1952).

[4] A. Hunger, J. Kebrle, A. Rossi und K. Hoffmann, Exper. *13*, 400 (1957).

[5] F. Gross, Helv. physiol. Acta *5*, C 31 (1947).

[6] A. F. Green und P. A. Young, Brit. J. Pharmacol. *6*, 572 (1951).

Tabelle I

Relative analgetische Wirkungsintensität verschiedener Benzimidazolderivate bezogen auf Morphin. Die Zahlen in Klammern geben die absoluten Morphindosen in mg/kg an. Die Zahlen *1–14* betreffen die in der Tabelle der voranstehenden Mitteilung[4] angeführten Verbindungen.

Verbindung Nr.	Analgesie			
	Maus subkutan	Maus per os	Ratte subkutan	Kaninchen intravenös
Morphin	1 (5)	1 (25)	1 (2)	1 (5)
1	1/10	–	–	1/5
2	1/10	1/2	1/10	1/2
3	0	–	–	–
4	3	5	–	10
5	2	–	–	5
6	1/3	–	–	–
7	1/3	1/2	–	1/2
8	3	5	1	10
9	1/10	–	–	–
10	2	1	–	10
11	10	3	10	10
12	10	10	–	50
13	100	15	30	200
14	1000	1250	1000	1000

Tabelle II

Mittlere Letaldosen bei intravenöser und peroraler Gabe an der Maus, intravenöse Letaldosis am nichtvorbehandelten und narkotisierten Kaninchen sowie atemhemmende Dosis in Urethannarkose (1,4 g/kg subkutan). Alle Dosen in mg/kg.

Verbindung Nr.	LD_{50} Maus		Kaninchen		
			mittlere Letaldosis		Vermind. der Atemfrequenz um 50% (nark.)
	intravenös	per os	nicht vorbehandelt	narkotisiert	
Morphin	200	1000	250	1,0	0,5
1	50	–	50	25,0	10,0
2	50	500	50	25,0	10,0
3	50	–	–	25,0	keine Hemmung
4	50	500	50	0,5	0,25
5	50	200	25	1,0	0,25
6	50	–	–	50,0	0,50
7	50	500	50	10,0	2,5
8	50	100	25	0,25	0,17
9	100	–	–	10,0	5,0
10	25	200	25	0,5	0,25
11	25	400	> 50	0,2	0,10
12	10	250	25	0,1	0,025
13	50	100	50	0,025	0,010
14	1	25	0,5	0,0025	0,0005

erreichen, wobei sich die wirksamsten der bisher dargestellten Präparate ergaben.

Verlauf und Dauer der Wirkung sind bei den Benzimidazolderivaten im allgemeinen kürzer als bei Morphin. Bei täglicher subkutaner Injektion an der Ratte nahm die analgetische Wirkung nach 8–10 Tagen ab, so dass es erforderlich war, die Dosis zu steigern, um einen gleichen Effekt zu erreichen. Diese Gewöhnung entspricht dem bei Anwendung anderer Analgetika an der Ratte und der Maus beobachteten Verhalten.

Das Vergiftungsbild der analgetisch stark wirksamen Verbindungen ist an der Maus durch Verminderung der Atemfrequenz, Erregungssymptome, Schwanzphänomen und in Subletaldosen durch Krampferscheinungen charakterisiert. Die mittleren Letaldosen liegen für die meisten Derivate bei intravenöser Gabe zwischen 25 und 50 mg/kg, lediglich bei den Verbindungen Nr. *12* und *14* geht mit der Zunahme der Wirkungsintensität auch eine Steigerung der Toxizität einher, wobei jedoch bei Verbindung Nr. *13* und *14* die therapeutische Breite grösser ist als bei den weniger wirksamen Verbindungen (Tabelle II). Am Kaninchen und an der Ratte ist das Wirkungsbild neben der Analgesie durch eine zunehmende Sedation bis zu Narkosestadium I/II und Miose charakterisiert. Der Hund zeigt ähnliche Symptome wie das Kaninchen, während bei der Katze Erregungserscheinungen und ebenso wie unter Morphin eine Mydriase auftreten. Mit der wirksamsten Verbindung Nr. *14* war am Hund mit Dosen von 0,001 mg/kg intravenös eine deutliche Verminderung und mit 0,0025 mg/kg eine volle Aufhebung der Schmerzreaktion auf Kneifen am Ohr zu erreichen; gleichzeitig trat Speichelfluss und bei der höheren Dosis Durchfall auf.

Am narkotisierten Tier ist die Toxizität erheblich gesteigert, der Tod erfolgt an Atemlähmung (Tabelle II). Bei künstlicher Beatmung sind dagegen die Letaldosen ungefähr gleich wie beim nichtnarkotisierten Tier. Die Atemdepression lässt sich durch Analeptika wie Coramin oder Bemegrid aufheben. Der Blutdruck des narkotisierten Kaninchens und der Katze wird durch Dosen, die zu einer mindestens 50prozentigen Abnahme der Atemfrequenz führen, nicht sicher beeinflusst, während die Herzfrequenz um etwa 10–20% abnimmt.

Ähnlich wie bei Morphin war ein antipyretischer Effekt der stark analgetisch wirkenden Substanzen am Kaninchen gegenüber der durch Bakterientoxine ausgelösten Temperatursteigerung nachweisbar, jedoch erst in Dosen, die ein Mehrfaches der analgetischen Schwellendosis betragen und bereits die Atemfrequenz vermindern. Das gleiche gilt für die entzündungshemmende Wirkung, die sich in einer geringeren Ödembildung bei der Senfölchemosis am Kaninchenauge oder nach Injektion von Dextran in die Rattenpfote äussert.

Im Gegensatz zu Morphin rufen die analgetisch wirksamen Derivate am isolierten Kaninchendarm keine Tonisierung hervor, sondern bedingen in Konzentrationen von 10^{-4} (g/ml) eine Abnahme der Pendelbewegungen. Am isolierten Kaninchenuterus führen dagegen die meisten Verbindungen zu einer allerdings schwächeren Tonisierung als Morphin. Spezifische spasmolytische Eigenschaften liessen sich nicht nachweisen.

Die Auffindung dieser neuen Gruppe hochwirksamer Analgetika zeigt, dass synthetische Verbindungen, für die sich auf Grund der Strukturformel keine Verwandtschaft zum Morphinmolekül mehr erkennen lässt, ein qualitativ sehr ähnliches Gesamtwirkungsbild wie Morphin hervorrufen können. Die für die Schmerzempfindung verantwortlichen Substrate des Zentralnervensystems lassen sich somit offenbar in verhältnismässig unspezifischer Weise ausschalten, und gleichzeitig verändern die in dieser Hinsicht wirksamen Substanzen auch andere Substrate (Atemzentrum, vagale Substrate) in ihrer Aktivität. Die Tatsache, dass bisher keine stark wirkenden Analgetika bekannt geworden sind, denen zusätzliche Wirkungen auf Atmung und bestimmte zentrale parasympathische Funktionen fehlen, spricht für eine ähnliche Organisation der gleichzeitig beeinflussten Zellkomplexe.

F. Gross und H. Turrian

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 26. August 1957.

Summary

A number of basically substituted benzimidazoles show a strong analgesic activity in mice, rats, rabbits, and dogs. Qualitatively they act very similarly to morphine and corresponding synthetic analgetics and the most active of these compounds are quantitatively superior to all analgetics hitherto described.

Kinetics of Penicillinase Activity

Penicillinase, next to catalase, has one of the highest turnover numbers known ($1{\cdot}48 \times 10^5$ M of substrate hydrolysed per min at 30°)[1]. It is of interest then to determine whether MICHAELIS-MENTEN kinetics applies in this instance.

Rate of hydrolysis of benzyl penicillin by penicillinase from *B. subtilis* (commercial preparation; Commonwealth Serum Laboratories, Australia) has been investigated by a slight modification of the method of WISE and TWIGG[2]. Preliminary experiments having shown that the effect of potassium chloride in the range of concentration 0·002–0·08 M on the rate was negligible, a constant ionic strength of 0·02 maintained by potassium chloride was used in the present investigation.

Results indicate that the reaction follows MICHAELIS-MENTEN kinetics[3], at least between concentrations of substrate 20 and 0·2 times the apparent MICHAELIS constant K_m'. This is evident from a plot of

$$\frac{(t+[S])}{V'} \text{ against } \log[S].$$

(Fig. 1; where t is the time in minutes, $[S]$ is the concentration of penicillin remaining, and V' is the apparent maximum [zero order] velocity expressed as mole per min · 10^5, at 25° C, pH 6·58 and ionic strength 0·02.)

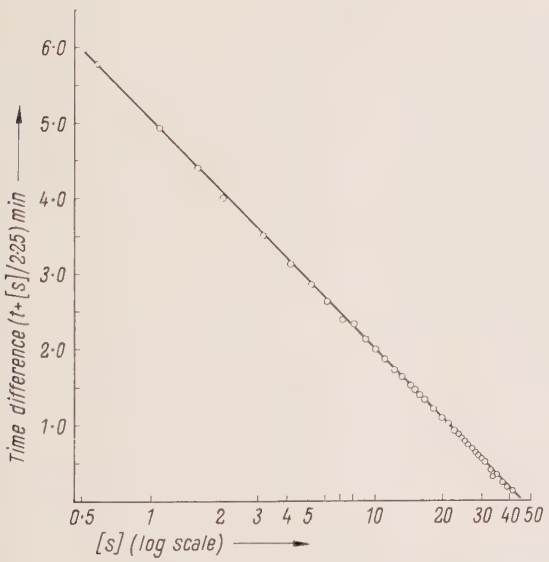


Fig. 1.
Time difference plot (see text for explanation).

Linearity of the time difference

$$(t + [S] \div V' + \text{constant};$$

i.e. actual time, less time calculated for zero order kinetics) with log $[S]$ is in accord with the relationship

$$-V' \cdot t = [S] + K_m' \ln[S] + \text{constant}$$

obtained on integration of the MICHAELIS-MENTEN rate equation[3].

Variation with pH of the parameters V' and K_m', estimated by LINEWEAVER-BURK plots[4] and corrected for the second dissociation constant of penicilloic acid $pK_{A,2}$ 5·35[5], is summarised in Figure 2. These results are

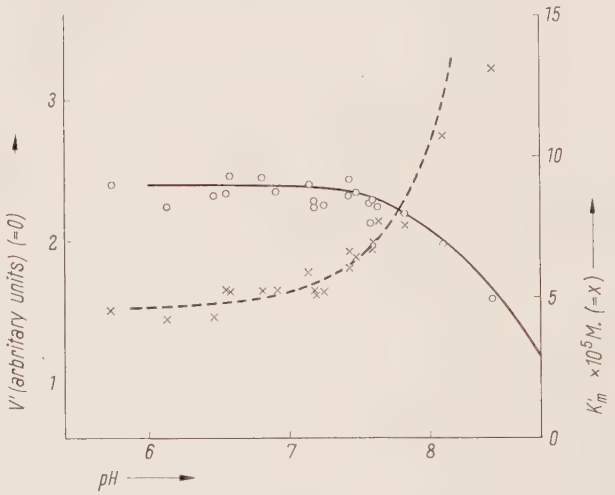


Fig. 2.
Variation of the parameters V' and Km' with pH.

consistent with competitive inhibition of the enzyme by hydroxyl ions involving functional groups of $pK_A \sim 7{\cdot}9$, and with anti-competitive inhibition[6] involving functional groups of $pK_A \sim 8{\cdot}8$. Curves shown in the Figure represent the expected variation of the parameters calculated[7] on this basis.

At pH 7·14 and in the temperature range 22° to 43° C, the parameters V' and K_m' show a variation with temperature in accord with the ARRHENIUS equation[8]:

$$V' = A\, e^{\frac{-5700}{RT}}$$

and

$$K_m' = 1{\cdot}46 \times 10^{-4}\, e^{\frac{-700}{RT}} \quad M$$

where $R = 1{\cdot}99$ cal per degree, and A is a constant. A slight deviation observed at 47° may be due to partial inactivation of the enzyme under these conditions.

Variation of the parameters K_m' and V' were less than the experimental error either for a threefold dilution of the enzyme or for change in concentration of the reaction products in the range 3×10^{-4}–3×10^{-3} M.

[1] M. R. POLLOCK, A. M. TORRIANI, and E. J. TRIDGELL, Biochem. J. *62*, 387 (1956).
[2] W. S. WISE and G. H. TWIGG, Analyst *75*, 106 (1950).
[3] L. MICHAELIS and M. L. MENTEN, Biochem. Z. *49*, 333 (1913).
[4] H. LINEWEAVER and D. BURK, J. Amer. chem. Soc. *56*, 658 (1934).
[5] R. MOZINGO and K. FOLKERS, *The Chemistry of Penicillin* (editors H. T. CLARKE, J. R. JOHNSON, and R. ROBINSON, Princeton, University Press, 1949), p. 573.
[6] W.A. RAWLINSON, Rev. pure appl. Chem. *6*, 110 (1956).
[7] W.A. RAWLINSON, Rev. pure appl. Chem. *6*, 118 (1956).
[8] S. ARRHENIUS, Z. physical. Chem. *4*, 226 (1889).

Variation of V' with pH (Fig. 2) is reasonably in accord with the results of Pollock *et al.*[9], who found the greatest zero order velocity to occur in the region of pH 6, but differs considerably from that found by earlier workers. It should be noted that failure to take account of singly ionised penicilloic acid (pK_A 5·35[5]) may introduce considerable error at pH values below 7 when an alkalimetric or manometric method is employed. For example, the uncorrected results of the present investigation led to a spurious flat topped maximum for V' between pH values 6·6 and 7·6. This may account in part for some discrepancies in the literature; maxima have been variously reported at pH 7·8[1], and 6·9–7·6[10], for example. In the latter case (manometric method) the flat topped curve described appears little different from the plot of uncorrected V' values obtained in the present investigation.

J. E. Banfield

Chemistry Department, University of New England, Armidale, N.S.W. (Australia), February 19, 1957.

Zusammenfassung

Die Kinetik der Penicillinhydrolyse durch Penicillinase aus *B. subtilis* ist mittels einer titrimetrischen Methode verfolgt und in Übereinstimmung mit der Gleichung von Michaelis und Menten befunden worden. Die pH-Abhängigkeit wird diskutiert.

[9] E. Manson, M. R. Pollock, and E. J. Tridgell, J. gen. Microbiol. *11*, 493 (1954).

[10] R. J. Henry and R. D. Housewright, J. biol. Chem. *167*, 559 (1947).

Biochemical Predetermination in *Drosophila*

In their paper chromatographic study of the development of *Drosophila melanogaster*, Hadorn and Mitchell[1] demonstrated that the eggs contained a blue fluorescent substance referred to as Fl 6. The material disappeared at the beginning of larval stages and did not reappear until the end of larval life. In young adults Fl 6 was clearly demonstrated only in females. No other fluorescent materials were found in the *Drosophila* eggs. In *Ephestia kühniella* the eggs have been shown to contain several fluorescent compounds[2]. Danneel and Zimmermann found that the Fl 6 of Hadorn and Mitchell is kynurenine[3]. As would be expected, kynurenine was not found in *vermilion* (*v*) flies, since this mutant is unable to carry out the synthesis of kynurenine from tryptophane[4].

The classical example of predetermination in *Ephestia* is believed to be due to the deposition of kynurenine or is some related compound in the eggs of kynurenine-containing females[5]. Thus the offspring of these females can form the ommochrome pigments derived from kynurenine regardless of their genotypically induced inability to synthesize kynurenine. Maternal inheritance has also been demonstrated with regard to the egg pigments of the silkworm, *Bombyx mori*[6]. By means of paper chromatography and fluorescence measurements, kynurenine metabolism can readily be studied quantitatively despite the absence of visible pigments in *Drosophila* eggs. Therefore it appeared to be of some interest to investigate possible maternal effects in *Drosophila melanogaster*.

Kynurenine in 200 eggs of various matings. The amount of kynurenine is expressed in terms of arbitrary units of fluorescence.

Mating	*n*	Fluorescence
$+ + \times +$	6	$120 \pm 3{,}0$
$+ v \times v$	6	$110 \pm 5{,}0$
$v v \times +$	6	$3{,}3 \pm 1{,}1$
$v v \times v$	6	$1{,}5 \pm 1{,}2$

Eggs from a vermilion strain clearly lacked kynurenine even when 400 eggs were used for a single chromatogram. With wild type flies of the strain Sevelen, a spot corresponding in Rf and fluorescence with kynurenine could readily be demonstrated with 50 eggs. The eggs were collected, from standard food containing yeast, with a needle and squashed with a glass rod directly on the paper for chromatography. No special steps were taken to free the eggs from the yeast with which they were contaminated since chromatography of yeast alone showed no fluorescent spots which would interfere with measurements of kynurenine. Ascending chromatograms were prepared using propanol—1% aqueous ammonia (2:1) as the developing solvent. In experiments involving fluorescent measurements, 200 eggs 1 ± 1 h old were used. After the solvent front had moved ca. 22 cm the chromatograms were removed and dried at room temperature. Chromatograms were examined for fluorescence with a long wave length UV lamp. Measurements were made directly on the paper using the method of Hadorn and Kühn[7]. Eggs produced by the matings $+v \times v$ and $vv \times +$ were compared with each other and with homozygous + and *v* eggs. Both the above-mentioned matings are expected to produce 50% + containing eggs although obviously different with regard to sex and heterozygosity.

The results of the fluorescence measurements are shown in the Table. The data indicate that the kynurenine content of the eggs is determined by the genotype of the mother. No kynurenine could be detected in the eggs of a *v* female crossed with a + male, regardless of the fact that all female eggs were now heterozygous for +. This was also found to be true within the limits of the technique with 200 eggs from the same cross 7 ± 1 h old. The kynurenine which is present in 1 h eggs from + mothers gradually disappears and by 17 h can barely be detected on the chromatograms. The values for the crosses $vv \times +$ and $vv \times v$ in the Table are probably due to background fluorescence and do not demonstrate the presence of any kynurenine.

These investigations seem to indicate that kynurenine accumulates in the ovaries of *Drosophila* and is deposited in the eggs. Chromatograms of the ovaries from mature females reveal large amounts of this substance. It is not

[1] E. Hadorn and H. K. Mitchell, Proc. nat. Acad. Sci. *37*, 650 (1951).

[2] A. Egelhaaf, Naturwissenschaften *43*, 165 (1956).

[3] R. Danneel and B. Zimmermann, Z. Naturf. *9b*, 789 (1954).

[4] G. W. Beadle, Chem. Rev. *37*, 15 (1945). – A. Butenandt, Naturwissenschaften *40*, 91 (1953).

[5] E. Caspari, Z. Vererbungslehre *71*, 546 (1936). – A. Kühn and E. Plagge, Biol. Zbl. *57*, 113 (1937). – A. Kühn, Abh. Preuss. Akad. Wiss. Berlin, Math.-naturw. Kl. *9*, 1 (1943). – E. Caspari, Quart. Rev. Biol. *24*, 185 (1948).

[6] H. Kikkawa, Adv. in Genetics *5*, 107 (1953).

[7] E. Hadorn and A. Kühn, Z. Naturf. *8b*, 582 (1953).

known whether the kynurenine is synthesized predominantly in the ovaries themselves, or elsewhere and only accumulated in the ovaries. Most of the kynurenine in the eggs must be metabolized during embryonic development since it has virtually disappeared at the time of hatching. It would not seem to be essential since there is almost certainly none present in the fully viable eggs of vermilion mothers. The kynurenine actually formed by + embryos, if any, must be much less than that ordinarily deposited in the eggs.

This work would appear to demonstrate a clear case of maternal predetermination. The phenotype of the egg is determined solely by the mother. In some respects it resembles rather closely the classical example of predetermination in *Ephestia*. In addition it demonstrates, as does the work on the mutant biochemica of *Ephestia*[7], how simple biochemical techniques reveal striking differences that are not detectable by classical morphological methods.

The author is very grateful to Professor Ernst Hadorn for his advice and assistance.

The work was aided by a postdoctoral fellowship grant of the American Cancer Society.

G. E. Graf

Institute of Zoology and Comparative Anatomy, University of Zürich (Switzerland), June 6, 1957.

Zusammenfassung

Der Gehalt an Kynurenin in Eiern von *Drosophila melanogaster* wurde papierchromatographisch untersucht. Ein Vergleich verschiedener Kreuzungen zwischen dem Wildtyp und der Mutante *vermilion* (*v*) zeigt, dass die Kynureninmenge mütterlich bestimmt wird und vom Genotypus der Eier unabhängig ist.

Vegetative Entwicklung und Fertilität einiger annueller Pflanzenarten unter dem Einfluss verschiedener konstanter Temperaturen

Der Einfluss konstanter Temperaturen unter gleichzeitigen konstanten Verhältnissen des Lichtes (Dauerlicht von 3500 ± 150 Lux) auf vegetative Entwicklung und Fertilität einiger annueller Pflanzenarten wurde im Earhart Plant Research Laboratory[1] untersucht. Die Arten waren nach dem Gesichtspunkt verschiedenen Verhaltens gegenüber der Temperatur in ihrem spontanen Vorkommen ausgewählt worden. Sie wurden in Vermiculite, der mit einer Nährlösung gleichmässig feucht gehalten war, herangezogen[2]. Die Messungen und Bestimmungen, deren Ergebnisse hier dargestellt sind, erfolgten, wenn ein bestimmter gut kenntlicher Entwicklungszustand erreicht war[2]. Die Variabilität der untersuchten Eigenschaften geht aus der Tabelle hervor, in der neben den aus den einzelnen Wiederholungen (12) errechneten Mittelwerten die mittleren Fehler (*m*) angegeben sind. Bevor die Pflanzen den oben und in den Abbildungen gekennzeichneten Bedingungen ausgesetzt waren, wuchsen sie in Gewächshäusern mit kontrollierten Temperaturen (23° von 8 bis 16 Uhr, 17° von 16 bis 8 Uhr) im natürlichen Licht, bis *Setaria pumila* 3, die anderen Arten 4 Blätter entwickelt hatten.

Die einzelnen Arten zeigen in konstanten Temperaturen teilweise ein sehr gegensätzliches Verhalten. *Setaria pumila* besitzt zum Beispiel in einer hohen Temperatur (26°C) optimale Höhe; bei dieser hohen Wärme vermag dagegen *Senecio vulgaris* unter den Versuchsbedingungen nicht auf die Dauer zu leben. Bei *Senecio vulgaris* sind die Pflanzen bei tiefen Temperaturen (7°C) am höchsten, bei denen *Setaria pumila* sich nicht entwickeln kann. Die Optima für verschiedene Eigenschaften der gleichen Art können aber auch an unterschiedlichen Stellen liegen[3]. Es ergibt sich namentlich, dass die günstigen Verhältnisse für die Fertilität meist auf einen viel engeren Temperaturbereich beschränkt sind als diejenigen für das vegetative Wachstum. Zum Beispiel zeigt *Agrostemma githago* bei 7°C noch ein ausgezeichnetes, allerdings langsames Wachstum und zahlreiche grosse Blüten. Jedoch besitzen die Früchte bei diesen Temperaturen unter den Versuchsbedingungen keine fertilen Samen mehr. *Galinsoga parviflora* besitzt bei 26°C noch ein gutes Höhenwachstum. In den Körbchen erscheinen noch zahlreiche Blüten, die jedoch durchwegs steril sind. Die Optima für die Anzahl der fertilen Samen und Früchte liegen meist mehr in mittleren Temperaturbereichen als diejenigen der an-

[1] F. W. Went, Chronica Botanica *12*, 89 (1950).

[2] Weiteres hierüber in: R. Knapp, Ber. dtsch. bot. Ges. *69*, 399 (1956).

[3] Hierüber auch in: A. H. Blaauw *et al.*, zit. in F. W. Went, Ann. Rev. Plant Phys. *4*, 347 (1953). Ferner in R. Knapp, Angew. Botanik *29*, 125 (1955).

Tabelle

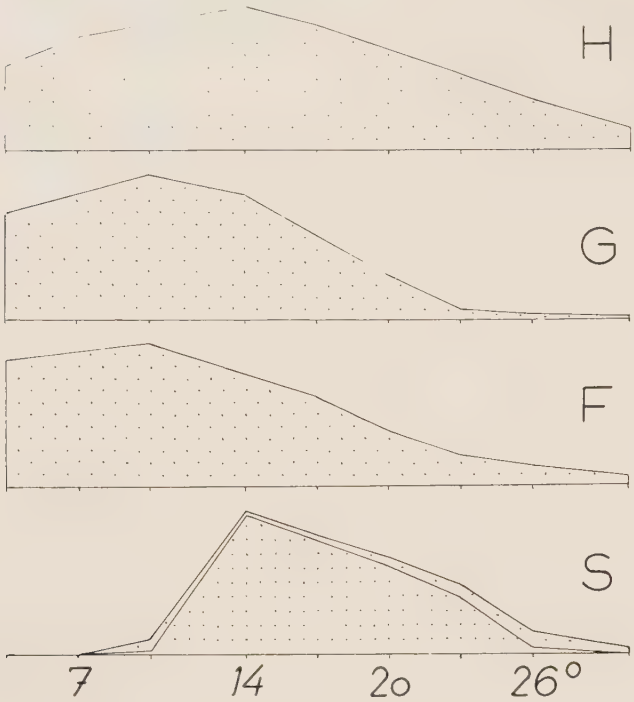
	Agrostemma githago bei 14°C	*Galinsoga parviflora* bei 14°C	*Setaria pumila* bei 23°C	*Senecio vulgaris* bei 10°C
Höhe des Sproßsystems (cm) . . .	99,6 ± 3,73	112,1 ± 2,02	93,9 ± 2,55	77,5 ± 3,18
Trockengewicht (Sproßsystem, g) .	3,19 ± 0,165	7,40 ± 0,528	2,14 ± 0,149	1,45 ± 0,086
Anzahl der Früchte bzw. Fruchtstände pro Pflanze[4]	3,4 ± 0,21	620,5 ± 10,4	3,17 ± 0,23	42,3 ± 2,0
Anzahl der fertilen Samen bzw. Früchte pro Frucht bzw. Fruchtstand[5]	31,8 ± 1,36	24,9 ± 1,12	–	37,0 ± 2,1
Gesamtzahl der Samen bzw. Blüten oder Ährchen pro Frucht oder Blütenstand[6]	32,7 ± 1,37	32,3 ± 4,55	129,4 ± 4,55	52,3 ± 2,6

[4] Bei *Agrostemma* Früchte, bei den anderen Arten Fruchtstände pro Pflanze.

[5] Bei *Agrostemma* fertile Samen pro Frucht, bei *Galinsoga* und *Senecio* fertile Früchte pro Körbchen.

[6] Fertile und sterile Samen bzw. Blüten. Bei *Agrostemma* Samen pro Frucht. Bei *Galinsoga* und *Senecio* Blüten pro Körbchen. Bei *Setaria* Ährchen pro Blütenstand.

deren Eigenschaften. Die Abbildung zeigt die Verhältnisse bei *Agrostemma githago*. Aus ihr sind noch weitere



Agrostemma githago L. bei verschiedenen konstanten Temperaturen (Abszisse). *H* Höhe des Sproßsystems, *G* Trockengewicht, *F* Anzahl der Früchte pro Pflanze, *S* Anzahl der Samen pro Frucht; obere Linie Gesamtzahl, untere Linie (engpunktierter Bereich) = Anzahl der fertilen Samen. Höchste Höhe in jedem Teildiagramm = grösster festgestellter Wert (= 100%. Absolute Werte in der Tabelle).

Beziehungen zwischen den Optimalbereichen der einzelnen untersuchten Eigenschaften zu ersehen.

R. Knapp*

Earhart Plant Research Laboratory, Abteilung Biologie, California Institute of Technology, Pasadena, 26. April 1957.

Summary

The influence of a series of constant temperatures on some annual plant species was studied in otherwise constant conditions. There are big differences in the behaviour of the species. But also within a species the properties studied can have different optimal temperatures. These differences are especially characteristic in some cases for the properties of fertility and of the vegetative growth. One species, for instance, can under certain conditions be very high and can even have numerous big flowers, but the plants can be simultaneously entirely sterile.

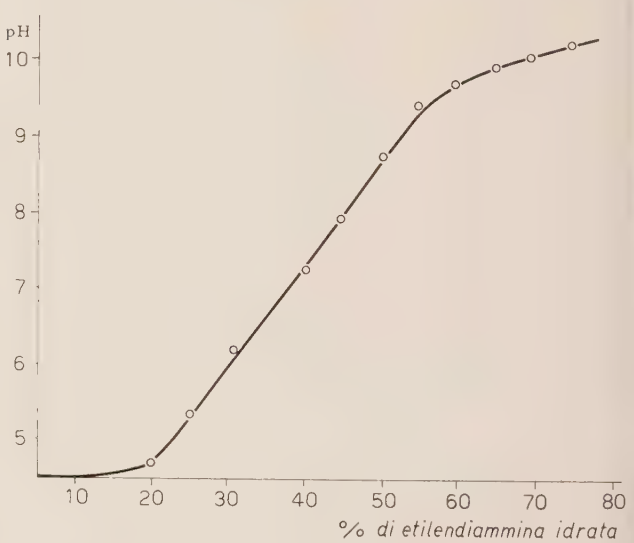
* Gegenwärtige Adresse: Botanisches Institut der Universität Giessen (Deutschland).

Nuovo tampone volatile da impiegarsi in cromatografia ed elettroforesi

Lo sviluppo di procedimenti elettroforetici e cromatografici a scopi preparativi, e l'impiego della elettroforesi bidimensionale su carta e della elettroforesi associata a cromatografia su carta per la separazione di miscele non risolvibili con una sola corsa, ha imposto l'uso di tamponi costituiti da sali facilmente eliminabili.

I numerosi metodi proposti per la desalificazione di composti isolati con procedimenti elettroforetici o cromatografici presentano infatti serii incovenienti. L'adsorbimento, su carbone, polvere di cellulosa, gel di fosfati calcici, ecc., e la successiva eluzione del composto in esame in solventi facilmente eliminabili mal si adattano per le inevitabili perdite a scopi preparativi o quantitativi. Il metodo elettrolitico di Consden *et al.*[1] può venire impiegato solo quando si vogliano isolare nella soluzione desalificata degli anioni «deboli»; si deve inoltre notare che alcune sostanze si alterano durante il procedimento; l'arginina ad esempio viene trasformata in ornitina[2].

Durante la desalificazione con resine a scambio ionico, si possono avere notevoli variazioni del pH. L'estrazione del materiale in esame mediante solventi organici determina frequentemente una diminuzione della resa ed un aumento del costo della preparazione. Per di più tutti questi procedimenti di desalificazione sono applicabili esclusivamente a soluzioni, ma non possono essere impiegati in una elettroforesi bidimensionale quando si voglia liberare le carte dopo la prima corsa, dai sali derivanti dalla soluzione tampone, che le impregnano.



L'impiego di tamponi volatili, eliminabili per evaporazione, risulta invece pienamente soddisfacente e non richiede altra operazione se non quella necessaria all'allontanamento del solvente. Il numero di tamponi volatili fin'ora noti è limitato. Ricordiamo gli acetati e formiati di piridina[3], collidina[4] e ammonio[5] e, di uso più recente, gli acetati, i formiati, i bicarbonati ed i carbonati di trietilamina e trimetilamina[6]. Questi ultimi, pur essendo i più vantaggiosi vanno incontro durante la concentrazione ad un abbassamento del pH. Ciò è probabilmente riferibile al fatto che in essi il catione (trietilamina = p. eboll. 89°C), evapora prima dell'anione

[1] R. Consden, A. H. Gordon e J. P. Martin, Biochem. J. *41*, 590 (1947).
[2] W. H. Stein e S. Moore, J. biol. Chem. *190*, 103 (1951).
[3] H. Michl, Mh. Chem. *82*, 489 (1951).
[4] G. G. F. Newton, E. P. Abraham, Biochem. J. *58*, 103 (1954).
[5] C. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein, J. biol. Chem. *195*, 669 (1952).
[6] J. Porath, Nature *175*, 478 (1955).

(acido acetico = p. eboll. 118,1°C). Ciò può costituire un inconveniente notevole quando si lavori con sostanze stabili solo in ristretti limiti di acidità.

Allo scopo di eliminare questo inconveniente abbiamo studiato un nuovo tampone volatile capace di mantenere inalterato il pH durante la concentrazione. Risponde a tale scopo l'acetato di etilendiamina. L'etilendiamina bolle a 118°C, ha cioè un punto di ebollizione molto prossimo a quello dell'acido acetico (118,1°C), il tampone può pertanto venir concentrato sotto vuoto a varie temperature senza variare sensibilmente il suo pH. Questo tampone è ormai da più di un anno in uso con buoni risultati nel nostro laboratorio.

Oltre a questa favorevole caratteristica l'acetato di etilendiamina: 1) può essere eliminato per liofilizzazione secondo Stein e Moore[2], 2) a differenza dei sali di piridina non interferisce nelle determinazioni della densità ottica allo ultravioletto, 3) permette lo svolgersi di numerose reazioni chimiche senza interferirvi, 4) a differenza dei sali di collidina che subiscono l'ossidazione anodica è relativamente stabile alla ossidazione, 5) può essere applicato alla cromatografia degli aminoacidi in quanto non interferisce nella reazione alla ninidrina secondo Moore e Stein[7] quando si raccolgano dalla colonna aliquote di 0,1–0,5 ml nelle quali la concentrazione della amina sia pari o inferiore al 0,05 *M*.

Il diagramma indica come si debbano miscelare soluzioni 0,05 *M* di etilendiamina ed acido acetico per ottenere liquidi aventi una determinata acidità (pH a 20°C). La molarità dei tamponi così ottenuti è particolarmente adatta per l'elettroforesi su colonna di cellulosa.

P. Fasella, C. Baglioni e C. Turano

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma, il 17 maggio 1957.

Summary

A volatile ethilendiamine-acetate buffer is described which is capable of keeping the pH unaltered during volatilization. The advantages of this buffer in electrophoretic and chromatographic procedures, in comparison with other volatile buffers, are discussed.

[7] S. Moore e W. H. Stein, J. biol. Chem. *176*, 367 (1948).

Motility of Leukocytes in Slide Cells

Martin *et al.*[1] found that the speed of guinea pig leukocytes migrating in closed slide cells is constant during the first 6 h of incubation and moves in a linear fashion with time. Similar curves of the migration of leukocytes were obtained by Elberg and Schneider[2]. In the curves obtained by Ketchel and Favour[3] during the study of the motility of human leukocytes in sealed capillary tubes, leukocytes also migrated at a constant rate during the first 6–8 h of incubation.

In studying the motility of human leukocytes (Poláková[4], Polák and Poláková[5], Polák, Poláková, and Škvaril[6]), our results were not in full agreement with those obtained by the above-mentioned authors. A more detailed analysis of leukocyte motility was therefore carried out.

Methods.—Leukocyte motility was studied in slide cells by a slightly modified method (Martin *et al.*[1]). The cells were prepared from silicone-coated standard microscope slides. The experiments were carried out on the blood of blood donors. The concentration of heparin (Novo) used in our experiments was 0·001 mg/cm³ of blood. After filling, the slide cells were sealed hermetically and centrifuged at 2200 rpm for 10 min, thereby separating the blood into erythrocytes, leukocytes and plasma layers. The slide cells were then examined directly under the microscope and those in which in isolated cases, leukocytes were found in the plasma layer, were excluded. The slide cells were then placed in incubators at an angle of 70°. During this procedure the blood and slide cells were kept at a temperature of +1 – +30°C.

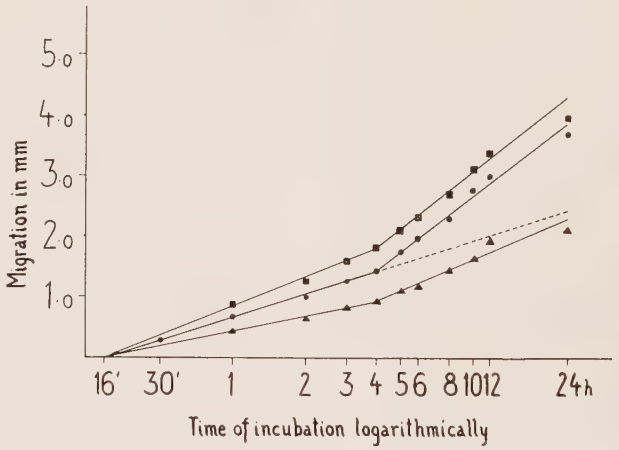


Fig. 1.—Migration curves at different temperatures. *x* time plotted logarithmically, *y* migration in mm. Upper curve —40°C, middle curve —37°C, lower curve 30°C. The points on the curve are arithmetic means.

The rate of the leukocyte migration was read under a microscope in the same slide cells at definite time intervals inside the thermostabile chamber.

Results.—The blood of 37 blood donors was examined. In parallel slide cells, filled with the blood of the same blood donor, the measurements of the rate of migration were carried out at intervals of 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 24 h at a temperature of 30, 37, and 40°C. For technical reasons, it was not possible to carry out the readings at all time intervals. In slide cells incubated at 37°C, migration was also read off after 30 min.

The statistical evaluation of the influence of both increased (40°C) and decreased (30°C) temperature on leukocyte motility was carried out in such a way that migration values at 37°C was taken as a basis, the differences were calculated and evaluated using *t*-test (Cramér, 1946). The results are shown in the Table.

In Figure 1, where the migration was plotted semilogarithmically in time, the migration curves at different temperatures are shown. From these it follows that leukocyte motility increases at 40°C and decreases at 30°C as compared with the leukocyte motilities at 37°C.

[1] S. P. Martin, C. H. Pierce, G. Middlebrook, and J. Dubos, J. exp. Med. *91*, 381 (1950).
[2] S. S. Elberg and P. Schneider, J. infect. Dis. *93*, 36 (1953).
[3] M. M. Ketchel and C. B. Favour, J. exp. Med. *101*, 647 (1955).
[4] K. Poláková, Cs. pediatrie *10*, 101 (1955).
[5] H. Polák and K. Poláková, Acta haemat. *16*, 385 (1956).
[6] H. Polák, K. Poláková, and Škvaril, Cs. pediatrie *11*, 464 (1956).

Time in hours		½	1	2	3	4	5	6	8	10	12	24
37°	n	11	23	33	25	34	24	35	18	12	13	37
	M	314·1	698·0	1016·9	1305·3	1455·7	1740·8	1980·7	2348·0	2791·2	3073·8	3716·9
	σ	54·6	209·8	326·4	450·4	537·8	525·7	550·6	654·9	694·0	711·9	1010·8
Δ 30 – 37°	n		8	8	9	10	8	11	8	6	6	11
	Δ_1		267·5	390·0	417·0	548·5	595·2	759·3	841·1	1066·6	1107·0	1488·5
	$\sigma\Delta_1$		167·5	347·5	288·1	452·7	369·8	546·0	622·9	425·8	472·5	864·0
	t		4·2276	2·971	4·0932	3·6304	4·2577	4·3980	3·5725	5·6014	5·2381	5·4471
	P		0·01	0·05	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01
Δ 37–40°	n		22	32	24	32	23	33	17	11	12	34
	Δ_2		202·4	278·6	356·5	419·4	429·6	440·7	457·9	349·0	340·0	301·4
	$\sigma\Delta_2$		102·4	141·3	185·5	190·0	211·6	236·3	248·9	236·2	297·9	534·7
	t		4·5826	10·94	9·2136	12·296	9·5250	10·7947	7·3578	4·6724	3·7841	1·8600
	P		0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·01	0·1

It can be seen from Figure 1 that the migration proceeds in two straight lines intersecting at the 4th hour.

Both parts of the experimental curve can be expressed by exponential equations of the type $t = b \cdot e^{c \cdot \mu}$ expressing the law of growth. In the equation: t = time; μ = migration in μ; c, b = constants.

In our experiments migration starts between the 15th to 16th min (as seen by direct observation) which corresponds to the time necessary for the formation of a fibrin network on which the leukocytes move inside the slide cells. Up to the 4th hour the curve follows a straight line. For the calculation of this part of the curve (at a temperature of 37°C) values of 30 min and 4 h were used. The equation may be expressed:

$$\mu = \frac{\log t - \log b}{c \cdot \log e} .$$

The constants were calculated:

$b = 0{\cdot}256$ dependent on the time at which migration starts;

$c = 0{\cdot}00189$ dependent on the rate of migration.

Therefore $\mu = 1220 \cdot \log t - 721$.

At the 4th hour, the slope of the curve abruptly changes and becomes steeper. This second phase can be calculated similarly from the values obtained at 4 and 10 h with the resulting equation $\mu = 3250 \cdot \log t - 502{\cdot}5$.

The rate of migration (r) at individual time intervals was calculated as the function of time. For the first phase:

$$\frac{\Delta \mu}{\Delta t} = 1220 \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{\ln 10}$$

which becomes after simplification:

$$r_1 = \frac{530}{t}$$

for the first phase,

$$r_2 = \frac{1412}{t}$$

for the second phase, which are hyperbolic equations.

The course of the migration rate in the different time intervals is shown in Figure 2. A striking feature of the curve is the sharp increase in the rate of migration at about the 4th hour of incubation, the nature of which we have tried to elucidate. We found that the sudden increase in the migration rate is not caused by a sudden change in pH, nor is it caused by a change in rH, in which the chief changes occur during the first 30 min.

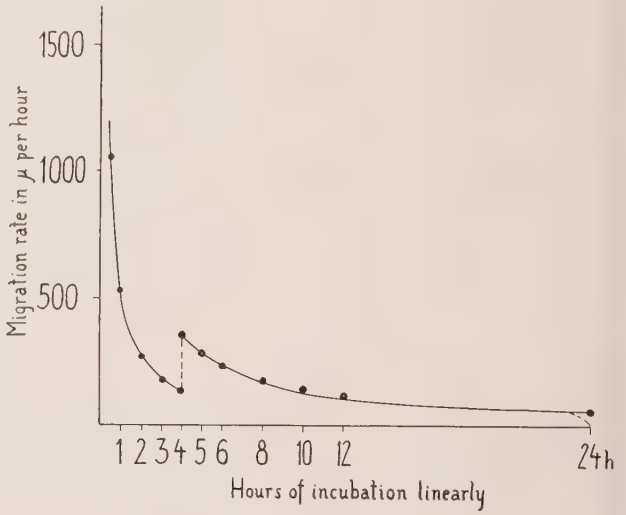


Fig. 2. – Migration rate at different time intervals. x time in hours, y rate of migration in μ/h.

It may be asked whether the increase in the migration rate at about the 4th hour is not due to metabolic or degeneration products of the leukocytes themselves and whether a similar process does not occur in tissues during inflammation.

J. Nemec, H. Polák, J. Neuwirth, Z. Zita, and P. Blažková

3rd Clinic for Internal Diseases, Charles University, Prague, April 11, 1957.

Zusammenfassung

Die Leukozytenbewegung wurde in Glaskammern während 24 h Inkubation beobachtet: die Kurve der Leukozytenbewegung besteht aus 2 Phasen, welche mittels 2 Exponentialgleichungen (durch das Wachstumsgesetz bestimmt) ausgedrückt werden können.

In der vierten Stunde der Inkubation tritt eine Steigerung der Leukozytenbewegung auf.

Die Leukozytenbewegung bei einer Temperatur von 30 und 40°C wurde mit der bei 37°C verglichen: Die Leukozytenbewegung ist bei 30°C langsamer und bei 40°C schneller als bei 37°C.

Die Beeinflussung der Leukozytenphagozytose mit Phlorrhizin

In letzter Zeit sind wiederholt Beobachtungen mitgeteilt worden, nach welchen für die Phagozytentätigkeit der Leukozyten neben biophysikalischen Faktoren auch Zellstoffwechselprozesse eine wichtige Rolle spielen. In dieser Richtung zeigen die Untersuchungen von Baldridge, Gerard[1], Köhler, Bauer, Müller[2], Delaunay und Lebrun[3], sowie unsere eigenen Beobachtungen[4].

Nach mehreren Befunden greift Phlorrhizin in den Kohlenhydrat-Intermediärstoffwechsel ein. So wurde nachgewiesen, dass es die Resorption von Zucker aus dem Darm modifiziert (Verzár, Bogdanove, Barker und Brückner[5]).

Die Wirkung hängt mit der Phosphorylierung zusammen. In bezug auf den Angriffspunkt von Phlorrhizin hatte Shapiro[6] nachgewiesen, dass es das Dehydrogenasesystem lähmt und dadurch die Kreatinphosphorsäure- und Adenosintriphosphorsäure-Synthese hemmt.

Im Hinblick auf diese Angaben schien es uns interessant zu untersuchen, wie Phlorrhizin auf die Phagozytosentätigkeit der Leukozyten mit lebhaftem Kohlenhydratstoffwechsel wirkt.

Die Versuche wurden an 150–200 g schweren, aus der gleichen Zucht stammenden Ratten vorgenommen. Wir bestimmten bei den Tieren mit nüchternem Magen die Leukozytenzahl (Granulozyten und Lymphozyten) im kreisenden Blut und untersuchten sodann die Phagozytentätigkeit der Granulozyten. Hiernach erhielten die Tiere innerhalb von 24 h intraperitoneal 2 × 0,25 ml 10prozentige ölige Phlorrhizin-Suspension. 8–10 h nach der letzten Injektion wurde bei nüchternem Magen erneut die Leukozytenzahl und das Ausmass der Phagozytose bestimmt.

Die Phagozytenuntersuchungen erfolgten nach dem Verfahren von Platonow-Ludány-Vajda. Aus der Schwanzvene wurde 0,05 ml Blut entnommen und 0,85 ml 5 mg% Heparin enthaltende Ringer-Lösung sowie 0,1 ml Bakteriensuspension (abgetötete *Staphyl.-pyogenes-aureus*-Keime, 1 $mm^3 = 10$ Mill. Kokken) zugegeben. Es wurde gezählt, wieviele Mikroorganismen von 400 Leukozyten phagozytiert wurden. Die Fehlergrenze der Zählung ist $\sigma < \pm 8\%$. Als Wirkung der Phlorrhizinbehandlung trat im Harn der Tiere eine Reduktion von Fehling-Lösung auf.

Die Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst. Wie aus dieser hervorgeht, hatte die Phagozytose nach Anwendung von Phlorrhizin in allen Fällen abgenommen. Die Veränderung schwankte zwischen – 19 und – 47%, der Mittelwert ist – 33,5%. In der Leukozytenzahl kam es während der Versuche zu keiner wesentlichen Änderung. Nach Verlauf von 48 h näherte sich die Phagozytentätigkeit wieder dem Ausgangswert. In den Kontrolluntersuchungen hatten die Tiere intraperitoneal nur die entsprechende Menge gereinigtes *Oleum helianthi* bekommen; es trat keine signifikante Abweichung auf.

Auf Grund unserer Versuchsergebnisse kann daher festgestellt werden, dass die Bakterienphagozytose der Granulozyten durch Phlorrhizin wesentlich herabgesetzt wird. Der Effekt steht aller Wahrscheinlichkeit nach mit den Kohlenhydratstoffwechsel-Veränderungen der Leukozyten im Zusammenhang (ähnlich wie bei Darmschleimhaut und Muskel). Die Erscheinung ist reversibel und bei der verwendeten Dosis bereits nach 48 h verschwunden.

Die Resultate liefern einen neuen Beweis für die Auffassung, dass bei der Phagozytentätigkeit der Leukozyten neben physikalischen Faktoren auch Stoffwechselprozesse eine wichtige Rolle spielen, wobei selbstverständlich zwischen diesen sehr enge Wechselwirkung besteht.

G. Ludány, A. Döklen und E. Tóth

Pathologisch-Physiologisches Institut der Universität Budapest, 23. April 1957.

Summary

In the rat the intraperitoneally administered phlorrhizin significantly reduces the phagocytosis of bacteria by leucocytes, as determined by the Platonow-Ludány-Vajda method, with the mean decrease being – 33·5%. The effect is reversible. The phenomenon appears to be due to an alteration of carbohydrate metabolism in the leucocytes. The experiments supply new evidence supporting the view that alongside biophysical factors (surface effects) also cellular metabolic processes may play important roles in the phagocytotic activity of leucocytes.

[1] C. W. Baldridge und R. W. Gerard, Amer. J. Physiol. *103*, 235 (1933).

[2] V. Köhler, R. Bauer und H. Müller, Arch. exp. Path. Pharm. *212*, 214 (1951).

[3] J. Lebrun und A. Delaunay, Ann. de l'Inst. Pasteur *80*, 524 (1951).

[4] G. Ludány, L. Perényi, J. Sós und Gy. Vajda, Arch. int. Pharmacodyn. *104*, 176 (1955). – G. Ludány, L. Perényi, J. Sós und J. Vajda, Arch. int. Pharmacodyn. (erscheint demnächst).

[5] F. Verzár, *Absorption from the intestine* (Longmans, London 1936). – J. Brückner, Helv. physiol. Acta *9*, 259 (1951).

[5] F. Verzár, *Absorption from the intestine* (Longmans, London 1936). – J. Brückner, Helv. physiol. Acta *9*, 259 (1951). – E. M. Bogdanove und S. B. Barker, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *75*, 77 (1950).

[6] B. Shapiro, Biochem. J. *41*, 151 (1947).

Tabelle

Zahl der Versuche	Zahl der phagozytierten Staphylokokken. Vor der Injektion	Änderung der Phagozytose in %. Nach der Injektion		Bemerkungen
		24 h	48 h	
10 6	442(358 – 568) 402(396 – 480)	– 33·5 [– 19 – (– 47)] + 0·6 [– 8 – (+ 7)]	– 2·6 [+ 3 – (7)] + 1·0 [+ 2 – (– 3)]	Phlorrhizin-Injektion Öl-Injektion (Kontrolle) ($\sigma < \pm 8\%$)

Weitere Untersuchungen über die Wirkung von ACTH auf die Phagozytose der Leukozyten

Wir haben in früheren Untersuchungen auf die Zusammenhänge zwischen der Nebenniere und der Phagozytose der Leukozyten hingewiesen[1].

Unter anderem konnte festgestellt werden, dass Cortison, in pharmakologischer Dosis verabreicht, die Fresstätigkeit hemmt[2].

ACTH, in therapeutischer Dosis beim Kaninchen angewandt, modifiziert die Phagozytose der weissen Blutzellen ebenfalls. Wir fanden, dass der Effekt nach einer einzigen Injektion in zwei Phasen verläuft. Auf eine Herabsetzung der Phagozytentätigkeit erfolgt eine Steigerung von ungefähr gleicher Intensität[3].

Es scheint, dass diese diphasische Erscheinung mit der Grösse der Dosis in Zusammenhang steht. Wir untersuchten deshalb die Wirkung kleinerer ACTH-Gaben. Die Versuche wurden an 10 Kaninchen aus der gleichen Zucht vorgenommen. Es wurden regelmässig bestimmt: die absolute Zahl der weissen Blutzellen (Granulozyten, Lymphozyten), sowie nach Platonow-Ludány und Vajda das Ausmass der Leukozytenphagozytose. Die Entnahme des Blutes erfolgte aus der Ohrvene. Zu 0,1 ml Blut wurde 0,8 ml 5 mg% Heparin enthaltende Ringer-Lösung sowie 0,1 ml Bakteriensuspension (*Staphylococcus pyogenes aureus*, teils abgetötete, teils virulente Keime, 1 mm^3 = 10 Mill. Coccen) zugesetzt. Es wurde hierauf ausgezählt, wieviel Coccen 400 Leukozyten aufgenommen hatten. Die Veränderung der Phagozytose wurde auf dem Diagramm als Mittelwert in Prozenten zusammen mit der Veränderung der weissen Blutzellenanzahl angegeben. Fehlergrenze der Phagozytosenbestimmungen: $\sigma < \pm 8\%$. Die etwa 3 kg schweren Tiere erhielten intramuskulär 0,5 E ACTH (Cibacthen, Cortrophin).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wird die Phagozytose der Leukozyten von ACTH in der angewandten Dosis bereits nach einer Stunde signifikant erhöht. Den Höhepunkt erreicht die Wirkung nach etwa 2 h.

Während dieser Zeit nimmt die Anzahl der Granulozyten zu, die der Lymphozyten, wie zu erwarten war, nimmt ab. Der Effekt klingt nach 4 h ab. Bei Anwendung dieser Dosis zeigt sich die Wirkung auf die Phagozytose der Leukozyten nur in der Erhöhungsphase. Der diphasische Effekt, der sich nach grosser Dosis (10–15 E) einstellt und die Senkung der Phagozytoseintensität betrifft, kam unter dieser Versuchsbedingung nicht zustande. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die bei den Leukozyten nach ACTH-Gabe eintretende Veränderung der Phagozytose – die Steigerung bzw. Senkung – im Zusammenhang mit der im Organismus zirkulierenden Hormonmenge steht. Die Widersprüche in der Literatur sind mit grösster Wahrscheinlichkeit auf diese Tatsache zurückzuführen. Dafür spricht auch die Feststellung von Crabbé, wonach beim Kaninchen die Fresstätigkeit der aus der Pleurahöhle gewonnenen Makrophagen von Cortison in kleiner Dosis gesteigert wird[4].

[1] F. Kokas, G. Ludány und Gy. Vajda, Quart. J. exp. Physiol. *36*, 89 (1951).

[2] G. Ludány, Gy. Vajda und E. Tóth, Experientia *9*, 28 (1953).

[3] Gy. Vajda, G. Horváth, E. Tóth und G. Ludány, XIX. Tag. d. Ung. Physiol. Ges., Pécs, 6.–9. VIII. 1953; Acta Physiol. Hung., V. Suppl. 95 (1954). – G. Ludány, Gy. Vajda, G. Horváth und E. Tóth, Acta Physiol. Hung. *7*, 431 (1955).

[4] J. Crabbé, Acta endocr. *21*, 41 (1956).

Auf Grund dieser Ergebnisse ist zu erwarten, dass dem Hypophysen-Nebennierensystem in der Phagozytose der Leukozyten – und damit auch in den mobilen zellulären Abwehrmechanismen des Organismus – eine wichtige Rolle zukommt. Diese Auffassung findet auch eine Stütze in den früheren Versuchsergebnissen: Wir erhielten nach Asphyxie, Anoxämie, Kältewirkung, Arbeitsleistung, Schmerzen, psychischen Affekten und verschiedenen anderen sympathico-adrenalen Erregungen Phagozytosesteigerung[5]. In diesem Sinne sprechen auch unsere Novocainversuche; Novocain steigert als Stressor den Corticoidspiegel des Blutes und gleichzeitig die Phagozytose der Leukozyten[6].

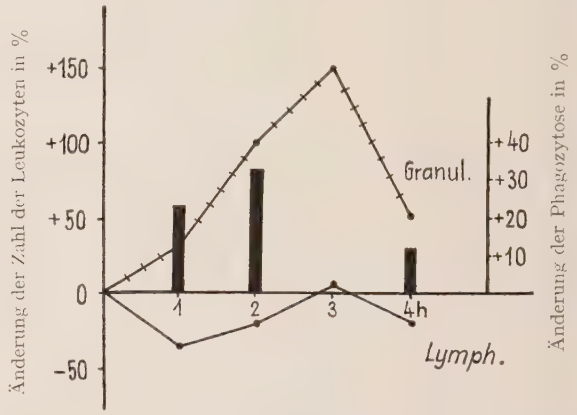


Abb. 1. Die Wirkung von ACTH (0,5 E.i.m.) auf die Zahl und Phagozytose der Leukozyten bei Kaninchen; Mittelwert der Versuche.

Dies lässt sich nach Selyes Konzeption mit der sogenannten «Alarmreaktion» (A-R) bzw. mit dem «allgemeinen Adaptationssyndrom» (G-A-S) in engeren Zusammenhang bringen.

G. Ludány, Gy. Vajda und A. Döklen

Patho-Physiologisches Institut der Universität Budapest, 23. April 1957.

Summary

In rabbit experiments it has been proved that smaller doses of ACTH (0·2 U/kg) enhance the phagocytosis of bacteria by leukocytes. The effect develops as early as 1 h after injection, reaches the peak at about 2 h (mean: 32%) and is over in 4 or 5 h. Only larger doses diminish phagocytotic activity.

[5] G. Ludány, Gy. Vajda, E. Reviczky und Cs. Sztankay, Acta neuroveg. *2*, 263 (1951).

[6] G. Ludány, T. Gáti, I. Mitzbán, J. Rigó und P. Földvári, Orv. Hetilap (Ung.) *98*, 38 (1957).

Neurosecretion and Metamorphosis in the Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas)

It is well established in insects that the initial hormonal stimulus to moulting is secreted by neurosecretory cells in the brain. This also applies to *Heteroptera* where removal of the neurosecretory cells of the pars intercerebralis region of the brain prevents the next moult when performed before a critical period[1].

[1] V. B. Wigglesworth, J. exper. Biol. *17*, 201 (1940). – K. K. Nayar, Curr. Sci. *25*, 192 (1956).

In the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, two groups of 5 neurosecretory cells each are very conspicuous in the pars intercerebralis region of the brain. In nymphs, as in adults, these so-called *A* cells stain dark purple with the aldehyde fuchsin technique and blue-black with Gomori's chrome hematoxylinphloxin. Due to their bluish-white colour these cells are visible in the living nymphs. In a series of experiments, they were extirpated in 57 last stage nymphs (47 females, 10 males) during the first day after the preceding moult. 19 specimens (17 females, 2 males) survived the operation and moulted again, which resulted in 17 adults and 2 female sixth stage nymphs. As a control, 20 animals (10 females, 10 males) were operated upon in the same way, except that a small piece of the lateral part of the brain was removed. 18 of the controls (8 females, 10 males) made another moult which gave origin to 16 adults and 2 female sixth stage nymphs.

In order to confirm that the extirpation of the *A* cells was being performed early enough, another series of 10 animals (3 females, 7 males) was operated upon within 4 to 6 h after they had reached the fifth nymphal stage. 4 of these specimens (1 female, 3 males) moulted to adults.

It may be that not all *A* cells were successfully extirpated in all specimens. As a control, therefore, some of the operated animals which made another moult, were sectioned and stained with the aldehyde fuchsin method or Gomori's chrome hematoxylinphloxin. The study of this material showed that specimens would moult even when the *A* cells were completely extirpated as early as 4 h after the preceding moult.

Under the present conditions, the experimental animals moulted to adults, on the average, 10 to 11 days after the operation, whereas operated controls made the adult moult, on the average, 8 to 9 days after the experiment. The difference in the rates of mortality among experimental and control animals indicates that the two operations are not quite comparable. The delay of moulting among the experimental animals may therefore be due to the severity of this operation, rather than to the lack of *A* cells.

Most of the mortality was due to specimens which did not feed properly after the operation. 9 individuals, however, survived for 10 to 16 days after the extirpation, but died without any signs of the moulting process. These specimens did feed and it may be that the prevention of moulting was due to the lack of *A* cells. What is of interest, however, is that so many specimens would moult even after an extirpation of these cells early in the last stage. The understanding of the concept of neurosecretory systems may give the explanation to this[2]. As in the bug *Iphita*[3], neurosecretory material in *Oncopeltus* is transported from the *A* cells to the walls of aorta. Before the onset of moulting, large quantities of neurosecretory material is present in the regions of aorta adjacent to the corpora cardiaca-allatum. During metamorphosis a depletion of material takes place. This is also observed in specimens which lack the *A* cells. It gives the most plausible explanation of why moulting is possible in such individuals.

A. S. Johansson

Zoological Laboratory, University of Oslo (Norway), June 14, 1957.

[2] B. Scharrer and E. Scharrer, Biol. Bull. *87*, 242 (1944).
[3] K. K. Nayar, Z. Zellforsch. *44*, 697 (1956).

Zusammenfassung

Exstirpation der 10 neurosekretorischen *A*-Zellen der Pars intercerebralis führt bei *Oncopeltus* nicht zum Ausfall der letzten Larvenhäutung. Es wird angenommen, dass das Neurosekret der *A*-Zellen, welches in der Aortenwand gespeichert wird, die Häutung ermöglicht.

The Gonadotrophic Activity of Date Palm Pollen Grains

It is commonly claimed in Egypt that pollen grains of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) are effective in the treatment of both male and female infertility. Previous investigations by Hassan and Wafa[1] indicated the presence of estrogenic activity in this type of pollen. Other investigators were able to isolate substances of plant origin with a gonad stimulating capacity (Friedman and Friedman[2]). In the present investigation it was decided to test for the presence of gonadotrophic effect in the protein moiety of this pollen grain.

20 pods were freshly obtained from Kerdasa during the month of March when the male pollen is ripe. The pollen was separated from the kernels with a fine gauze sieve, they were then weighed, defattened with petrolium ether and dried with acetone. The gonadotrophic principle was extracted by the method adopted by McShan and Meyer[3] for its extraction from acetone dried pituitaries. The extract was dissolved in distilled water and injected subcutaneously into male and female immature rats. Female rats were injected with an extract obtained from 10 g (fresh weight) pollen. The dose was divided into 6 equal parts injected twice daily for 3 days and the rats were killed with ether on the fourth day (Hamburger[4]). Male rats were also injected with extracts of 10 or 20 g pollen divided into 10 equal doses administered daily during a period of 10 days and the animals were killed on the day after the last injection (Deansly[5]). The ovaries, uteri, testes and seminal vesicles of the control and treated animals were dissected, weighed and examined histologically.

A glance at the accompanying tables indicates the presence of a suitable gonadotrophic action induced by pollen grain extracts. The ovary and testes weights of pollen-treated rats were heavier than those of their respective controls. The uterus and seminal vesicle weights were slightly increased by this treatment. This is evidence of a mild LH activity. The estrogenic and androgenic effects are functions of LH (Fevold[6] and Simpson *et al.*[7]). The gonadotrophic activity of pollen grains seems to be mainly of a follicle stimulating nature. When an extract obtained from 100 g pollen was injected intravenously into immature female rabbits, it resulted in an increase in the number of graafian follicles which were at different stages of development. It caused the maturation of the follicles and some of them were atretic, but ovulation did not take place.

[1] A. Hassan and H. Abou El Wafa, Nature *159*, 409 (1947).
[2] M. H. Friedman and G. S. Friedman, Amer. J. Physiol. *125*, 486 (1939).
[3] W. H. McShan and R. K. Meyer, J. biol. Chem. *135*, 473 (1940).
[4] C. Hamburger, Acta path. microbiol. Scand. *18*, 457 (1941).
[5] E. Deansly, Quart. J. Pharm. Pharmacol. *8*, 651 (1935).
[6] H. L. Fevold, Endocrinology *28*, 33 (1941).
[7] M. E. Simpson, C. H. Lee, and H. M. Evans, Endocrinology *30*, 977 (1942).

Table I

The influence of pollen grain extract on the reproductive organs of immature female rats

Treatment	No. of rats	Average body weight	Ovary weight in mg/100 g body weight	Uterus weight in mg/100 g body weight
Control	6	44·00	22·64 ± 0·89*	64·72 ± 7·54
Extract of 10 g pollen	6	43·33	33·93** ± 0·92	82·52 ± 6·72

* Standard error. ** Significantly different at the level of 0·1%.

Table II

The influence of pollen grain extract on the reproductive organs of immature male rats

Treatment	No. of rats	Average body weight	Testes weight in mg/100 g body weight	Seminal vesicle weight in mg/100 g body weight
Control	6	64·00	884·38 ± 29·80*	20·23 ± 0·98
Extract from 10 g pollen	6	63·40	1443·16** ± 30·60	32·87** ± 1·26
Extract from 20 g pollen	5	56·50	475·00** ± 9·55	22·89 ± 0·64

* Standard error. ** Significantly different at the 1% level of probability.

The histological picture of the testes of rats treated with pollen grain extract (10 g) showed a mild activation of spermatogenesis. Spermatozoa were universally distributed in the seminiferous tubules. There was also an increase in tubular diameter and Sertoli cells were well developed. The testes weights of the rats treated with extract from 20 g pollen decreased significantly from those of controls and rats treated with 10 g pollen. This is most probably due to the formation of anti-gonadotrophic hormone.

It is concluded then that date palm pollen grains contain a certain amount of gonadotrophic activity which is predominantly a follicle stimulating type with traces of LH. Further investigations are needed to determine quantitatively the different fractions of this hormone and to identify it by comparing its electrophoretic pattern with that of gonadotrophins of animal origin.

F. A. Soliman and Lucy Soliman

Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Cairo University, Giza (Egypt), April 9, 1957.

Résumé

Des grains de pollen de palmier-dattier furent libérés de leur matière grasse à l'ether et séchés à l'acétone. Une hormone gonadotrope en fut extraite à l'eau et précipitée à l'acétone. Administrée à des rats mâles ou femelles n'ayant pas atteints leur maturité, cette hormone extraite de 10 g de pollen (poids d'origine), provoque une augmentation de poids dans les gonades et les organes sexuels accessoires. L'examen histologique atteste aussi une activité spermatogénique et un développement folliculaire. Le principe gonadotropique devra être identifié chimiquement. Il semble avoir la propriété de stimuler les follicules et ne contenir que très peu de traces d'hormones lutéinisantes.

The Influence of Oestrogen and Progesterone on Pituitary Function

Recent studies indicated that the oxygen consumption and thyroid function of female rats undergo cyclic variations associated with the phases of oestrous cycle. Oxygen consumption and thyroid function were at their maxima during the phase of oestrus (Soliman[1], Soliman and Reineke[2]). It was also found that thyroid and thyrotrophic hormone production is increased during oestrus (Soliman and Badawi[3]). Thyroid function was also at its maximal during oestrus in rabbits (Soliman and Ghanem[4]) and sheep (Ghanem and Soliman[5]). Oestrogen increases thyroid activity in the presence of the pituitary (Soliman and Reineke[6]). It is also able to increase the oxygen consumption of rats only if the thyroids are present (Soliman and Ghanem[7]). Recently Feldman[8] concluded that the stimulating effect of oestrogen on the thyroid is a direct effect which is not mediated through the pituitary. Further more Mercier and Parot[9] suggest that this effect is pharmacological rather than physiological.

Administration of progesterone at a low level reduced the I^{131} uptake by the thyroids (Soliman and Reineke[6]). It was also noted that such doses of progesterone had a stimulating effect on oxygen consumption in the presence or absence of the thyroid (Soliman and

[1] F. A. Soliman, Egypt. Vet. J. *1*, 37 (1954).
[2] F. A. Soliman and E. P. Reineke, Amer. J. Physiol. *178*, 89 (1954).
[3] F. A. Soliman and H. M. Badawi, Nature *177*, 235 (1956).
[4] F. A. Soliman and Y. S. Ghanem, Nature *178*, 745 (1956).
[5] Y. S. Ghanem and F. A. Soliman, Brit. Vet. J. *112*, 462 (1956).
[6] F. A. Soliman and E. P. Reineke, Amer. J. Physiol. *183*, 63 (1955).
[7] F. A. Soliman and Y. S. Ghanem, Exper. (in press).
[8] J. D. Feldman, Endocrinology *58*, 327 (1956).
[9] L. Mercier and D. Parot, Bull. Micr. appl. *2*, 117 (1952).

Table I

Thyrotrophic, gonadotrophic and ACTH contents of rat's blood as indicated by weight of thyroids, testes and adrenals of 1-day-old male chicks.

Group No.	Treatment	No. of chicks	Thyroid weight	Testes weight	Adrenal weight
			In mg per 100 g body weight		
I	Castrated	5	7·33 ± 0·35*	33·98 ± 7·16	35·88 ± 4·61
II	Castrated + 4 μg oestradiol . . .	8	9·25 ± 0·19	26·05 ± 4·16	36·80 ± 3·36
III	Castrated + 0·4 mg progesterone .	5	8·21 ± 0·17	44·55 ± 2·63	44·14 ± 3·41
IV	Castrated + 4 μg oestradiol + 0·4 mg progesterone	5	8·41 ± 0·76	35·30 ± 4·00	38·14 ± 2·42

* Standard error.

Table II

Thyrotrophic, gonadotrophic and ACTH content of rats' pituitaries as indicated by weights of thyroids, testes and adrenals of 1-day-old male chicks

Group No.	Treatment	No. of chicks	Thyroid weight	Testes weight	Adrenal weight
			In mg per 100 g body weight		
I	Castrated	5	9·36 ± 0·88*	79·55 ± 6·00	28·59 ± 3·79
II	Castrated + 4 μg oestradiol . . .	5	9·16 ± 1·02	64·53 ± 7·12	34·06 ± 3·54
III	Castrated + 0·4 mg progesterone .	5	15·67 ± 1·15	58·57 ± 17·00	45·23 ± 2·60
IV	Castrated + 4 μg oestradiol + 0·4 mg progesterone	5	9·43 ± 0·33	70·34 ± 7·68	35·86 ± 5·31

* Standard error.

Ghanem[7]). In order to clarify the mode of action of these hormones, it was decided to estimate the levels of thyrotrophic, gonadotrophic and adrenocorticotrophic hormone contents of the pituitaries and blood of castrated rats treated with these hormones.

24 male albino rats weighing 150–170 g were used in this experiment. The rats were castrated, then divided into 4 groups containing 6 rats each. To standardize the iodine intake by the animals, they were injected subcutaneously with 5 μg NaI contained in 0·2 ml of distilled water daily. Oestradiol benzoate (B.D.H.) was diluted with sesame oil to contain 2 μg in 0·1 ml. Progesterone (B.D.H.) was also diluted with sesame oil. The injected dose of 0·4 mg progesterone was contained in 0·1 ml of oil. 21 days after castration, the rats in group II were injected with two doses of 2 μg of oestradiol 48 h before autopsy. Group III was injected with 0·4 mg progesterone and killed after 48 h. Group VI was injected with 2 doses of 2 μg of oestradiol, then with 0·4 mg progesterone on the next day, and killed 24 h later. Group I was kept as nontreated control. The animals were killed by decapitation under light ether anaesthesia, their blood collected and serum separated by centrifuging at 3000 rpm for 15 min. The pituitaries were dissected and weighed with a torsion balance. The thyrotrophic, gonadotrophic and ACTH contents were determined by the use of 1-day-old chicks (Smelser[10], Evans *et al.*[11], and Bates *et al.*[12]). Groups of chicks corresponding to each of the rats were given daily doses of either 0·1 mg pituitary contained in 0·1 ml saline, or 0·3 ml of serum for 4 days. The chicks were then killed with ether on the fifth day. The average thyroid, testes and adrenal weights of the male chicks were used as criteria of the levels of thyrotrophic, gonadotrophic and ACTH of the blood and pituitaries. The data were analysed statistically using the '*t*' test for testing the differences between the averages.

The accompanying tables, together with the statistical significance, show that the thyroids of the chicks treated with serum of rats given oestrogen alone, were heavier than those given sera obtained from other groups. It also appears that the thyrotrophic hormone content of the pituitaries of rats treated with progesterone was greater than that of the other groups. The level of gonadotrophic hormone in the blood of oestrogen treated rats was significantly lower than that of any of the other groups. The level of gonadotrophic hormone in the blood of progesterone treated rats was higher than that of the other groups. The ACTH content of the pituitaries of rats treated with progesterone as reflected on the chick adrenal weights was greater than that of the other groups.

It is concluded from these findings that oestrogen increases the rate of outpouring of thyrotrophic hormone into the blood stream, and this subsequently stimulates thyroid function. Progesterone seems to interfere with the release of thyrotrophic hormone resulting in the accumulation of this hormone in the pituitary. It appears also that oestrogen interferes with the synthesis and release of gonadotrophic hormone, while progesterone enhances the release of this hormone into the blood. The small dose of oestrogen used did not influence the formation or release of ACTH. Progesterone on the other hand interferes with its release from the pituitaries.

H. M. Badawi and F. A. Soliman

Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza (Egypt), April 9, 1957.

[10] J. K. Smelser, Endocrinology *23*, 429 (1938).

[11] J. S. Evans, L. Hines, R. Varney, and F. C. Koch, Endocrinology *26*, *1008* (1940).

[12] R. W. Bates, O. Riddle, and R. A. Miller, Endocrinology *27*, *781* (1940).

Résumé

24 rats mâles castrés furent divisés en 4 groupes de 6. Ils furent traités à des doses physiologiques de benzoate d'œstradiol, de progestérone ou d'une combinaison des deux hormones. On constata que l'administration d'œstrogène augmente la concentration de l'hormone thyréotrope dans le sang des rats, tandis que la concentration de l'hormone gonadotrope en est diminuée. D'autre part l'administration de 0,4 mg de progestérone augmente la concentration des hormones gonadotropes et adrénocorticotropes dans le sang des rats. Le progestérone augmente aussi la quantité d'hormone thyréotrope dans l'hypophyse.

Wirkung des Neurotoxins *Shigella Shigae* auf die Krampfbereitschaft

Es wird der Einfluss des Neurotoxins der *Shigella Shigae* auf experimentelle Krampfanfälle geprüft. Während Dysenterieerkrankungen sind bei Kindern in der Klinik des öfteren Krampfanfälle zu beobachten[1].

Laboratoriumsmäuse erhielten intraperitoneal 0,4 ml dieses Neurotoxins auf 20 g Körpergewicht. Die Verdünnung war 1:100. Bei dieser Dosis wurden in 3 Tagen 20% der Versuchstiere getötet. Von den überlebenden Mäusen zeigten nur einzelne Zeichen einer Intoxikation (Diarrhöe, Benommenheit, Paresen der Extremitäten). 72 h später wurde die Krampfbereitschaft geprüft und zwar mit der Methode der Kardiazol-, Elektroschock- und reflektorischen audiogenen Krämpfe.

Krampfart	Anzahl der Versuchstiere	Davon Krämpfe %	Anzahl der Kontrolltiere	Davon Krämpfe %	Statistische Signifikanz *P*
Kardiazol (60 mg/kg intraperitoneal) . .	30	46,6	30	16,6	0,02
Elektroschockkrämpfe	49	83,7	49	53,1	0,001
Audiogene Krämpfe	26	61,5	26	23,1	0,01

Wie die Tabelle zeigt, war die Krampfbereitschaft bei allen verwendeten epileptogenen Reizen erhöht. Diese Erhöhung ist statistisch gesichert.

Dieses Ergebnis bestätigt den in der Klinik gewonnenen Verdacht, dass Shigellatoxin krampffördernd wirkt.

A. Hrbek

II. Kinderklinik der Pädiatrischen Fakultät, Prag, 13. Juni 1957.

Summary

The neurotoxin *Shigella Shigae* increases the readiness for cardiazol, electroshock and reflectory audiogenic cramps.

[1] W. D. Donald, Ch. H. Winkler und L. M. Bargeron, J. Pediatr. *48*, 323 (1956).

Integrative Pattern of Reflex Actions by Impulses in Large Muscle Spindle Afferents on Motoneurones to Hip Muscles

Motoneurones are influenced by nerve impulses from various kinds of muscle receptors[1]. For example a slight stretch will cause a discharge in the large afferents (Ia fibres) from the muscle spindles. These impulses produce excitatory post-synaptic potentials (EPSP's) in the motoneurones on which they impinge monosynaptically and may thereby give rise to a reflex discharge of impulses.

The connexions which afferent Ia fibres make with different motor nuclei have been studied in detail on muscles operating at the knee and ankle joints by recording reflex discharges[2] and more recently by recording intracellularly the potential change occurring in individual motor nerve cells[3]. The excitatory action by Ia fibres coming from any particular muscle has been found to extend to motoneurones which subserve this muscle and to others which operate synergically at the same joint. One exception to this rule has been observed, namely the ankle extensor, soleus, which can be activated by Ia impulses from the knee extensor vasto-crureus[3].

Impulses in Ia fibres are known to exert inhibitory action on motoneurones of antagonist muscles evoking in them potential changes of opposite sign (so called inhibitory post-synaptic potentials, IPSP's). With knee and ankle muscles these inhibitory effects are strictly limited to the antagonists[4].

The present investigation has been concerned with the synaptic actions of Ia impulses onto motoneurones of hip flexors (iliopsoas and sartorius) and hip extensors (semimembranosus and adductor femoris). In Figure 1 intracellular records are shown from a typical iliopsoas motoneurone. The EPSP contributed by the nerve from iliopsoas itself (*A*) was of about the same size as that produced by an afferent volley from the synergist hip flexor, sartorius (*B*). In records *C–E* IPSP's are shown evoked as expected by afferent volleys from the antagonist hip extensors: adductor femoris (*C*), semimembranosus (*D*), and anterior biceps (*E*). In *F*, however, it is shown that a volley from the knee extensor, vasto-crureus, also contributed a similar IPSP. In other experiments in which it was possible to distinguish between fast and slow components (Ia and Ib) of the afferent group I volley[5], it has been ascertained that the IPSP's evoked by vasto-crureus volleys in hip flexor motoneurones are indeed produced by the Ia type afferents. This inhibitory action therefore represents an exception to the usual pattern of reciprocal innervation, and moreover, the inhibitory action contributed by the knee-extensor was larger than that coming from any single hip-extensor muscle.

Motoneurones of hip extensor muscles were found to receive excitatory effects from Ia afferents of other muscles than their synergists. Figure 2 shows EPSP's produced in a semimembranosus motoneurone by affe-

[1] C. S. Sherrington, *The integrative action of the nervous system* (New Haven and London, 1906).

[2] D. P. C. Lloyd, J. Neurophysiol. *9*, 439 (1946). – Y. Laporte and D. P. C. Lloyd, Amer. J. Physiol. *169*, 609 (1952).

[3] J. C. Eccles, R. M. Eccles, and A. Lundberg, J. Physiol. *137*, 22 (1957).

[4] D. P. C. Lloyd, J. Neurophysiol. *9*, 439 (1946).

[5] K. Bradley and J. C. Eccles, J. Physiol. *122*, 462 (1953). – Y. Laporte and P. Bessou, C. r. Soc. Biol. (in press 1957). – J. C. Eccles, R. M. Eccles, and A. Lundberg, J. Physiol. *136*, 527 (1957).

rent volleys from various hip extensor and knee flexor muscles. EPSP's were evoked in this motoneurone by volleys from its own muscle (*A*), from the other hip extensors, adductor femoris (*B*), anterior biceps (*C*), and characteristically also from the knee flexors, posterior biceps (*D*), gracilis (*E*) and semitendinosus (*F*). Inhibitory actions to semimembranosus neurones were

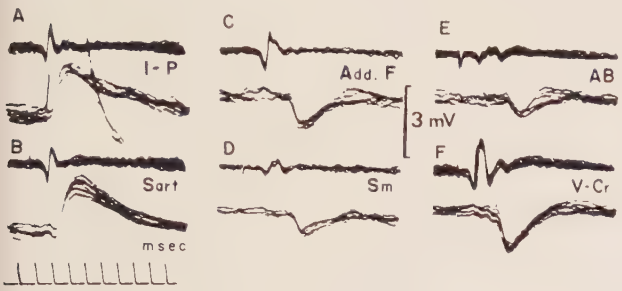


Fig. 1.—Intracellular recording from an iliopsoas motoneurone. Ventral roots were left intact for identification of the motoneurones. All records consist of many superimposed traces. Record *A* was obtained at a stimulus strength that was maximal for the Ia fibres and also at threshold for the motor axon. It illustrates the EPSP and the earlier arising spike evoked when the motor axon occasionally was excited. Record *B* shows the monosynaptic EPSP evoked by a maximal group I volley in the sartorius nerve. In records *C–F* are shown the IPSP's evoked by volleys from the adductor femoris (*Add. F.*), semimembranosus (*Sm*), anterior biceps (*AB*) and vasto-crureus (*V.Cr.*) nerves.

contributed by group Ia volleys from its antagonists iliopsoas and sartorius and also by rectus, which is not only a knee extensor, but being a double joint muscle, also a potential hip flexor. The Ia afferents from rectus will therefore be discharged either by flexion of the knee or like those of the proper hip flexors by an extension of

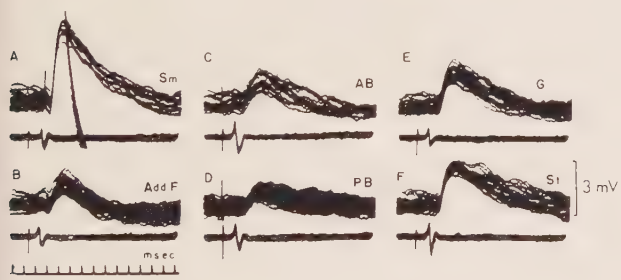


Fig. 2.—Intracellular recording from a semimembranosus motoneurone. Ventral roots were left intact for identification of motoneurones. All records consist of many superimposed traces. Record *A* was obtained with stimulation of the semimembranosus nerve at a strength that was maximal for all Ia fibres and also at threshold for the motor axon. It shows the EPSP and also the spike evoked when the motor axon occasionally was excited. In records *B–F* are shown the EPSP's evoked by volleys from the adductor femoris (*Add. F*), anterior biceps (*AB*), posterior biceps (*PB*), gracilis (*G*), and semitendinosus (*St*) nerves.

the hip, but most effectively by a combination of both movements. A further indication that this combined movement provided very effective inhibition of semimembranosus motoneurones was the finding that Ia impulses from the pure knee extensor, vasto-crureus, often produced some inhibition. Summarizing the reflex actions of the Ia-afferents, semimembranosus motoneurones are maximally excited by hip flexion combined with knee extension, and maximally inhibited by the opposite movement. The motoneurones of another hip extensor, adductor femoris, received no appreciable excitatory action from the knee flexors, but a considerable monosynaptic innervation from the knee extensor, vasto-crureus. The maximal contribution of excitation by Ia afferents to adductor femoris motoneurones would therefore occur during hip flexion combined with knee flexion.

The general conclusion to be drawn from this study is that the reflex innervation of motoneurones by the Ia system is not necessarily limited to muscles operating on the same joint either in its excitatory or inhibitory aspects. However, the reflex interconnexions between muscles operating at different joints are of a type which suggests that the Ia system subserves a sequence of co-ordinated movement and that these connexions have evolved to assist in the reflex coordination of stepping. For example the inhibition exerted by knee extensor afferents on hip flexor muscles can be seen to have functional significance if one considers that the step is initiated by hip flexion resulting in stretch of hip and knee extensors. This leads to discharge of impulses in Ia fibres from these latter muscles and initiates the next phase of the step beginning with inhibition of hip flexors and contraction of knee extensors and, presumably, of the hip extensor, adductor femoris.

R. Eccles and A. Lundberg

Department of Physiology, The Australian National University, Canberra, June 25, 1957.

Zusammenfassung

Es werden die intrazellulären Potentiale an Motoneuronen von Hüftmuskeln abgeleitet. Motoneurone des Hüftstreckers *Semimembranosus* werden von Ia-Impulsen der Hüftstrecker und Kniebeuger erregt, Motoneurone des Hüftstreckers *Adductor femoris* dagegen von den Hüftstreckern und Kniestreckern. Motoneurone der Hüftbeuger werden von Ia-Impulsen gehemmt, nicht nur von deren Antagonisten, sondern auch vom Kniestrecker *Vasto Cruralis*.

New Method for Determination of Radioactivity in Vegetal and Animal Tissues

This note is intended to give some preliminary information about the fairly satisfactory results obtained concerning radioactive substrata set in a Langsdorf diffusion chamber (modified type), used for the first time in the biological field.

This method is very sensitive and indicates even radioactivities of very low energy.

While the normal detectors are characterized by a threshold of energy, the diffusion chamber makes it possible to observe with the naked eye, or to photograph, any type of ionizing particles independently of their energy.

A great advantage of this method is being able to see the rising of radioactive particles on the surface of the substratum,

It is possible to identify, by means of the 'chamber', some characteristics of the radiation emitted (charge, mass, energy of the particles) and possibly to count the events which occur during the period of observation. The

modified Langsdorf chamber, being at continuous sensitivity, may present some advantages over the Wilson chamber which becomes sensitive only by expansion.

The instrument I have used, which was built at the Institute of Experimental Physics of the University of Milan (Milan Section of the National Institute of Nuclear Physics[1]), works at atmospheric pressure.

It consists of a double-glass-walled container with circular section, 35 cm inside diameter, 18 cm height, closed by a metallic bottom and by a 'roof'. The bottom is cooled down to – 45°C about by a Freon 22 single-phase compressor, having a power of 2 kW; the 'roof' presents a circular opening (20 cm diameter), closed by a crystal through which the events can easily be observed, photographed or filmed.

Some frame electrodes are set in the chamber, in order to produce a clarifying field, the intensity of which may be varied from 20 to 100 V/cm. There are also some annular trays containing liquid ethyl alcohol which is evaporated by armoured resistance.

Alcohol vapor diffuses in the whole chamber and falls downwards owing to gravity and is found in zones of progressively lower temperature.

The fall velocity is such that in a certain stratum, near the bottom, the vapor remains at the aeriform state, while it should be at the liquid state, according to the conditions of pressure and temperature (supersaturated vapor). In such conditions, the vapor is in unstable equilibrium and condenses on any nucleus of condensation.

In the supersaturation zone, the condensation first occurs on the atmospheric dust—the phenomenon lasts a short time (about 5 min)—and afterwards on the ions which happen to be present in the zone. If an ionizing particle passes into this zone, the ions it produces act as nuclei of condensation along its whole trajectory, giving rise to a trace formed by small drops of alcohol well visible to the naked eye.

The observation of the traces requires transverse lighting of the zone by means of an incandescent lamp, while for photography the field is lighted up with linear flashes.

Both flashes and release of the photographic shutter are synchronized by an automatic device. It is also possible to obtain stereoscopic photography of the images.

For determining the energy of the particles, the chamber contains a couple of Helmholtz coils, that are able to generate a magnetic field with a maximal intensity of about 1000 Gauss.

The substrata to be observed are set on special supports, refrigerated with liquid CO_2 and then let directly into the chamber; a few minutes are sufficient to reestablish the inner equilibrium of the instrument and, consequently, the best conditions for observation.

In order to set up the new method, I made several observations of letting into the chamber various substrata: bioptical drawings of animal and vegetal tissues, anatomic particles, vegetal seeds, young small plants, drops of liquids and mineral fragments, taking precautions not to contamine the chamber.

Among the most significant data obtained as yet, I wish to note that we found the presence of Thorium in the inner organs of a man who died owing to a hepatic sarcoma, 20 years after he had been inoculated with Thorotrast.

[1] A. Lovati and C. Succi, Il Nuovo Cimento *11*, 163 (1954).

The absorption of Uranium salts on the part of *Cicer arietinum* and *Faseolus vulgaris* young small plants, experimentally treated in the laboratory, was equally evident.

The method derived from the employment of the modified Langsdorf chamber may, in my opinion, prove very useful for research on ionizing radiations, both to obtain a new orientation and as a complement of the other radiobiological techniques.

Another work in press describes the instrument with full details and also the technique I have set up and the first data I have obtained.

I wish to thank the staff of the Institute of Experimental Physics (Milan University), which put the instrument at my disposal, and particularly Dr. C. Giori[2], who kindly helped me in this research work.

A. Pasinetti and C. Giori

Institute of Anatomy and Pathological Histology of the University of Milan (Italy), and Institute of Experimental Physics of the University of Milan (Italy), May 29, 1957.

Riassunto

L'autore descrive un nuovo metodo per l'osservazione di substrati biologici radioattivati, basato sull'impiego della camera a diffusione.

Questo strumento presenta notevoli vantaggi su quelli sinora impiegati in radiobiologia, perchè permette di osservare ad occhio nudo, fotografare ed identificare le caratteristiche di qualsiasi tipo di particelle ionizzanti, indipendentemente dalla loro energia.

La camera a diffusione è particolarmente indicata per lo studio delle radiazioni ionizzanti di bassa energia.

I risultati ottenuti dall'autore durante le osservazioni su organi animali e vegetali, su liquidi e minerali, sono stati assai soddisfacenti.

[2] National Institute of Nuclear Physics, Milan.

A Method for the Incorporation of Radioactive Isotopes in the Sea Urchin Egg

The usual method of incorporating radioactive isotopes in sea urchin eggs or embryos consists in incubating them in sea-water containing the isotope (among others Lindberg[1]; Hultin and Wessel[2]; Hultin[3]; Tyler and Monroy[4]). The chief disadvantages of this procedure are: (a) the aging of the unfertilized eggs during the 3 to 5 h of incubation necessary to obtain a measurable uptake; (b) the possibility that the uptake may vary in the different stages of development because of differences in permeability to the given labelled compound.

We have now worked out a method which seems to circumvent these difficulties and we wish to describe it briefly.

The experiments have been carried out with S^{35}-DL-methionine (purchased from the Radiochemical Centre, Amersham, England) in DL-methionine carrier at the

[1] O. Lindberg, Exper. Cell Res. *1*, 105 (1950).
[2] T. Hultin and G. Wessel, Exper. Cell Res. *3*, 613 (1952).
[3] T. Hultin, Ark. f. Kemi *6*, 195 (1953).
[4] A. Tyler and A. Monroy, Biol. Bull. *111*, 296 (1956).

concentration of 100 μc/100 μM of methionine/ml. 10 to 20 μc of this solution are injected into the body cavity of adult females of *Paracentrotus lividus* which are then left at room temperature in a moist chamber for 4 h.

The animals are cut open and the eggs collected by shaking the ovaries in sea-water. The eggs are then filtered through bolting silk and washed three times with sea-water. For chemical work, the jelly-coat was removed by treatment with acid sea-water. It proved to be free of radioactivity even after being concentrated by ethanol precipitation.

In the total homogenate of jelly-free unfertilized eggs specific activities of the order of 400 counts/min/mg total N have been obtained. No measurable loss of isotope has been found to occur during early development.

As is the case in the vertebrates, when isotopes are injected intraperitoneally, it may be assumed that also in this case the incorporation in the eggs is operated by the metabolism of the animal.

One of the advantages of this method seems therefore to be the avoidance of the long incubation of the eggs or embryos in sea-water containing the isotope. Furthermore it affords the possibility of following continuously the change in the distribution of the isotope among cell components starting from the base-line of the unfertilized egg. Investigations along these lines are in progress in this laboratory.

The present investigation has been supported by a Grant from Consiglio Nazionale delle Ricerche. The expenses for providing the measuring equipment have been defrayed by the Banco di Sicilia and the Cassa di Risparmio.

E. Nakano* and A. Monroy

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), June 22, 1957.

Riassunto

Con la iniezione di 10–20 μc di Metionina-S^{35} nella cavità celomatica di femmine adulte di *Paracentrotus lividus* si ottiene una rapida ed efficiente incorporazione dell'isotopo nelle uova. Si discutono i vantaggi del metodo rispetto a quello attualmente in uso.

* Aided by a Grant from the Rockefeller Foundation, on leave from the Nagoya University, Japan.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Bericht über die 4. Tagung für Elektronenmikroskopie des Schweizer Komitees für Optik

INSTITUT FÜR ALLGEMEINE BOTANIK DER EIDG. TECHNISCHEN HOCHSCHULE

23. Mai 1957

Die diesjährige Tagung wurde durch Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyssling eröffnet, der als Hauptreferenten Herrn Prof. Dr. V. E. Cosslett begrüssen durfte. In seinem kurzen Überblick über die gegenwärtige Situation der Elektronenmikroskopie in der Schweiz erwähnte Frey-Wyssling, dass es gerade zehn Jahre her sind, seit die ersten Bilder über den Feinbau von Gelen mit dem Elektronenmikroskop der Firma Trüb, Täuber & Co. erhalten wurden. An Hand von einigen Lichtbildern über die submikroskopische Struktur von pflanzlichen Zellwänden und Chloroplasten wurde der gewaltige Fortschritt aufgezeigt, den die stürmische Entwicklung der Elektronenmikroskopie in den letzten zehn Jahren erlaubt hat. Es wurde darauf hingewiesen, dass für eine rationelle Arbeit zwei Typen von Elektronenmikroskopen benötigt werden, einerseits solche von mittlerem Auflösungsvermögen für Routineuntersuchungen und zur Überwachung der Präparationsarbeiten, und anderseits Hochleistungsmikroskope, über die die Schweiz zur Zeit noch kaum verfügt, die es ermöglichen, ins Gebiet der makromolekularen Dimensionen vorzustossen. Um dieses Ziel zu erreichen, muss allerdings die Präparationstechnik für die meisten Objekte noch wesentlich verbessert und verfeinert werden.

Nach dieser Einführung ergriff Herr Prof. Dr. V. E. Cosslett das Wort, um über neue Ergebnisse seines eigenen und der übrigen Laboratorien in Cambridge zu berichten. Er verstand es vorzüglich, die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten dieses Gerätes in der Biologie, Medizin und Metallographie aufzuzeigen und an Hand zahlreicher instruktiver Bilder zu illustrieren.

Als zweites Referat der Vormittagssitzung folgte ein Vortrag von Herrn Dr. E. B. Baş über

Elektronenstrahler für Elektronenmikroskopie und Elektronenbeugung

Ausgehend von der heute erreichbaren maximalen Ausbeute des Fluoreszenzschirmes, für 100-kV-Elektronen ca. 5×10^5 asb/w.cm^2, und von der zu fordernden Minimalleuchtdichte des Fluoreszenzschirmes für eine sichere Scharfstellung sehr kontrastarmer Objekte von ca. 1 asb, lässt sich die minimale, im Endbild des Elektronenmikroskopes zu realisierende Stromdichte zu ca. 2×10^{-11} A/cm^2 ausrechnen. Multipliziert man diesen Wert mit der Endvergrösserung des Mikroskopes, so erhält man die im Objekt durch den Elektronenstrahler bereitzustellende Objektstromdichte; bei einem Hochleistungsmikroskop mit 200000facher Vergrösserung ca. 0,8/cm^2. Betrachtungen über die räumliche Kohärenz der Beleuchtungsstrahlen führen auf eine wünschenswerte Beleuchtungsapertur von ca. 10^{-4}, während praktisch in den meisten Fällen dieselbe bei 10^{-3} liegt und im äussersten Falle gleich der optimalen Objektivapertur von ca. 10^{-2} sein darf. Damit werden vom Elektronenstrahler folgende Richtstrahlwerte gefordert: bei hochkohärenter Bestrahlung ca. $2{,}5 \times 10^7$ A/cm^2, im praktischen Betrieb ca. $2{,}5 \times 10^5$ A/cm^2. Die Theorie zeigt, dass mit einer Emissionsstromdichte der Kathode von 3 A/cm^2 als *theoretischer Grenzwert* ein Maximal-Richtstrahlwert bei 100 kV von ca. 4×10^5 A/cm^2 zu erwarten ist. Vergleichende Zusammenstellung der an praktischen Elektronenstrahlern gemessenen Richtstrahlwerte zeigt, dass man in der Praxis in den meisten Fällen von dem theoretischen Optimum noch sehr weit entfernt ist. Eine Möglichkeit für die Realisierung sehr hoher Richtstrahlwerte besteht in der Anwendung der Thermo-Feld-Emission. Ein sehr bedeutender Punkt für die Anwendung hoher Richtstrahlwerte in der Elektronenmikroskopie ist die chromatische Kohärenz der Beleuchtungsstrahlen, welche nach den Messungen von Boersch so verschlechtert werden

kann, dass die hohe Auflösung des Mikroskopes in Frage gestellt wird.

E. B. Baş

Abteilung für Industrielle Forschung (AFIF), Zürich.

Spannungsabhängigkeit des Kristallformfaktors bei Feinstrahlbeugung

Erscheint demnächst in den Helv. Phys. Acta.

L. Wegmann

Fa. Trüb, Täuber & Co. AG., Zürich.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an komplexen Legierungen

Komplexe Legierungen mit mehr als 10 Bestandteilen werden zur Herstellung von Aufzugsfedern für Uhren gebraucht. Da diese Federn infolge ihrer Dimensionierung immer an der Grenze ihrer Festigkeit und Elastizität arbeiten und dabei bruchfest sein müssen, ist es äusserst wichtig, dass das Material absolut fehlerfrei ist.

Im lichtmikroskopischen Schliffbild sind die infolge der hohen Kaltverformung gerichteten Körner mit ihrem Gleitsystem sehr schön zu beobachten. Das elektronenmikroskopische Abdruckbild bringt hier nichts Neues.

In gewissen Fällen können im Lichtmikroskop Ausscheidungen beobachtet werden. Mittels Oxyd- oder Kohleabzugsmethoden kann diese Ausscheidung im Elektronenmikroskop sehr gut beobachtet werden. Leider ist die Elektronenbeugung an diesen Teilchen ohne viel Erfolg, da sie meist undurchstrahlbar sind oder aber bloss einige wenige Reflexe zeigen, die die Identifizierung der Ausscheidung nicht ermöglichen.

Es wird gehofft, mit Hilfe der Elektronensonde oder des Rastermikroskops hier neue Erkenntnisse zu gewinnen.

E. Schütz

Institut Straumann, Waldenburg.

Ionenätzung

In der Anwendung der Elektronenmikroskopie auf Probleme der konstitutionellen Metallurgie sind Präparationsmethoden wertvoll, welche ohne Abdrücke das Material selbst in Durchstrahlung zu untersuchen erlauben; neben einer vollen Ausnützung des dem Mikroskop eigenen Auflösungsvermögen wird dann die Untersuchung der strukturellen Verhältnisse durch Beugung und anschliessend die chemische Identifikation prinzipiell möglich. Eine dieser Methoden ist die Ionenätzung von Castaing und Laborie (1953), Fert (1954), Castaing (1955).

Gleichermassen ermöglicht die Ionenätzung die kontinuierliche Strukturuntersuchung von Oberflächenschichten mittels Elektronenbeugung im streifenden Einfall (Fert 1954, Trillat 1956).

Die Arbeitsbedingungen der Ionenätzung sind beschränkt (obere Grenze der Ionenenergie, abhängig von Gas), wenn Umkristallisationen (in feinstkörnigem oder stark verspanntem Material, Anregung zu Ausscheidungen) und Gasaufladung unter dem Ionenstrahl vermieden werden soll. Diese Phänomene hängen offenbar wesentlich mit der Ionenreichweite (nach einer semiempirischen Formel: < 10 Å) zusammen.

S. Steinemann

Laboratoire Suisse de Recherches Horlogéres, Neuchâtel.

Etudes complémentaires sur l'inclusion en polyester

Le Vinox K_3 servant de matériel d'inclusion ainsi que le mode d'inclusion ont subi des améliorations. La dureté du polymère a pu être diminuée jusqu'à une consistance voisine de celle du méthacrylate ce qui permet de le couper avec des couteaux cassés sous un angle de 40 à 45°. Des observations préliminaires montrent qu'une tendance aux tassements peut être diminuée sensiblement par l'adjonction de 5% de butyl-phtalate qui fonctionnerait comme lubréfiant. Deux produits d'inclusion parallèles, K_3 thermoplastique à prédominance d'alcool divalent et K_3 thermodurcissable à prédominance d'alcool trivalent ont été développés dont l'adjonction au produit de base permettent aux expérimentateurs d'adapter la dureté du Vinox K_3 au matériel à inclure. De nouveaux catalyseur et accélérateur ont été mis au point: Les deux étant liquides, leur mélange avec le Vinox en est facilité et une manipulation par goutte est rendue possible.

A. Ryter, W. Schwab, E. Kellenberger

Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Schnelle Einbettung von Geweben in Butylmethacrylat durch Polymerisation im ultravioletten Licht

Es wird eine einfache Versuchsanordnung besprochen, welche die Polymerisation von Butylmethacrylat unter Zusatz von 0,2 bis 0,5% Benzoin in Gelatinekapseln mit Gewebestücklein bei einer Umgebungstemperatur von 15–25° C innert 2 h gestattet.

Das Licht des Quecksilber-Hochdruckbrenners wird durch eine Wasserschicht von etwa 10 cm Dicke filtriert, bevor es die Präparate bestrahlt. Diese selbst werden von trockeneisgekühlter Frischluft umströmt.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung an Dünnschnitten lichtpolymerisierter Methacrylatblöcke ergab regelmässigere Resultate hinsichtlich der Erhaltung besonders der oberflächlichen Schichten des Gewebestückleins als die Wärmepolymerisation. Während Mitochondrienmembranen, Erythrozyten und Myelin gut erhalten bleiben, zeigen jedoch weniger dichte Bezirke, zum Beispiel das Kernplasma und Grundzytoplasma eine ungewohnte, feinretikulierte Struktur.

A. Vogel

Histopathologisches Institut der Universität und Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

Gefriertrocknung als Fixiermethode für Licht- und Elektronenmikroskopie

Es werden pflanzliche Gewebe nach der Fixation durch Gefriertrocknung mit solchen in lebendem und chemisch fixiertem Zustande verglichen. Die Gefriertrocknungsanlage arbeitet mit einer Öl-Diffusionspumpe (Endvakuum besser als 5×10^{-6} mm Hg, Leistung: 50 l/s) und besitzt einen Strickstoffinger zur Kondensation der sublimierten Wassermoleküle. Eine spezielle Vorrichtung ermöglicht die Einbettung in Methacrylat unter partiellem Vakuum. Durch die Polymerisation des Methacrylates mit ultraviolettem Licht einer Hg-Dampflampe (siehe oben) konnte in den nichtdenaturierten Chloroplasten von *Eucharis grandiflora* die submikroskopische Lamellenstruktur dargestellt werden. Bei zu

starker Erwärmung des Gewebes beim Einbetten wird diese Struktur zerstört. Eine Polymerisierung im Wärmeschrank (bei 50°C) ist daher mit gefriergetrocknetem Gewebe nicht möglich.

H. R. Müller

Institut für Allgemeine Botanik und Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich.

Versuche mit neuen Einschlussmitteln für die Elektronenmikroskopie

Fast allgemein hat man bisher die Ansicht vertreten, dass die Artefakte in den zu untersuchenden Zellen während der Fixierung und Entwässerung entstehen. Trotz vielen Vorsichtsmassnahmen in der Behandlung der Präparate, wie zum Beispiel tiefe Temperatur, der Zelle entsprechender pH-Wert, isotonisch eingestellte Lösungen usw. sind die Strukturen recht unterschiedlich erhalten. Es lag daher nahe, auch die Wirkung des Einbettungsmittels auf die Präparate genauer zu studieren. Aus mehreren Veröffentlichungen geht hervor, dass bei der Polymerisation des Methacrylates Quellungseffekte auftreten, die das Objekt zerstören können.

Als neue Einbettungsmittel wurden das von Kellenberger, Ryter und Schwab entwickelte «Vinox» und die von Glauert beschriebene «Araldit»-Methode ausprobiert. Beide Kunststoffe geben bei pflanzlichem Material bessere Resultate als die bisher verwendete Methacrylatmethode. Die Schnitteigenschaften dieser Stoffe sind gut, und es zeigt sich, dass die Abgrenzungen der verschiedenen Zellelemente schärfer, ihre Innenstrukturen besser erhalten sind als nach einer Methacrylateinbettung. Das Grundplasma ist fein globulär und nicht zu schraubigen Fäden koaguliert, wie das nach der herkömmlichen Einbettung häufig der Fall war.

K. Mühlethaler

Institut für Allgemeine Botanik und Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich.

Ein Zielpräparationsverfahren für elektronenoptische Untersuchungen

Zielpräparationsverfahren wurden unter anderen von Bethge, Gay und Anderson, Halldahl *et al.*, Leonhard, Seifert und Eckardt, Tischer und Lindner, sowie Zapf beschrieben bzw. angewendet. Das vorliegende Verfahren wurde für Schnitte und Abdrucke entwickelt und basiert, wie Rebucks Methode, auf der «Dry-» bzw. «Wetstrip-Technik». Ein Glasobjektträger wird mit einer geeigneten Folie überzogen; auf diese wird ein Wassertropfen aufgebracht, in den die Schnitte oder Abdrucke übertragen werden. Die auf der Tropfenoberfläche schwimmenden Präparate gleiten von selbst oder durch leichtes Anblasen an den Tropfenrand, der zum leichteren Auffinden an der Unterseite des Objektträgers mit Fettstift markiert wird. Man berührt hierauf die Kuppe des Tropfens mit einem Filterpapier und saugt dadurch ohne Beschädigen der Folie das Wasser ab; das beim langsamen Eintrocknen oft beobachtete Verschmutzen der Objekte wird auf diese Weise vermieden. Auf das Objekt wird unter phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle ein Athenenetz gelegt und nach Wunsch orientiert. Über das Netz wird ein dachförmiges Zigarettenpapier geschoben und ein Klebestreifen geklebt, mit dem man Netz, Präparat und Folie in der üblichen Weise abzieht. Der Bereich über dem Zigarettenpapier wird ausgeschnitten und die Folie mit Präparat und Netz auf Wasser abflotiert oder angefeuchtet; nach Abfischen auf Filterpapier und Trocknen haftet die Folie fest am Netz. Bei suspendierten Präparaten lässt man einen Tropfen der Suspension auf den mit Folie überzogenen Objektträger eintrocknen; weiterer Gang wie oben angegeben.

Das Verfahren bietet folgende Vorteile: Es kann ohne Spezialvorrichtung durchgeführt werden; Schnitte und Abdrucke trocknen meist glatt ohne Falten auf; Serienschnitte können bequem auf Athene-Schlitznetze aufgebracht werden. (Es ist hiebei möglich, aufeinanderfolgende Schnittbänder bei durchlaufendem Betrieb des Ultramikrotomes abzupräparieren); die Präparate können auf Glasobjektträgern für spätere Vergleichsuntersuchungen einfach aufgehoben werden; der Verbrauch an Netzen ist sehr gering.

H. Sitte

Physikalisches Institut der Universität, Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Innsbruck.

Verschiedene Verfahren zur Herstellung von Kohleabdrucken

Um mit Hilfe der von Bradley beschriebenen Methode gute Kohleabdrucke herstellen zu können, sind zwei Punkte zu beachten: Die Artefaktbildung während des Aufdampfvorganges und die Eigenstruktur des Abdruckes. Durch Ausschaltung oder durch Herabsetzung der Hitzeeinwirkung kann die Artefaktbildung unterdrückt werden. Einige Anhaltspunkte lassen vermuten, dass die Eigenstruktur des Abdruckes vom Reinheitsgrad der Kohle und von den Verdampfungsbedingungen abhängig ist.

H. Moor

Institut für Allgemeine Botanik und Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an meristematischen Pflanzenzellen

Wurzelspitzenzellen der Erbse wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Zur Fixierung sind Uranylsalze, Phosphorwolframsäure und Jod ungeeignet. Gute Fixierung in verschieden molarer, mit Pyridin neutralisierter Formaldehydlösung, weniger gut mit OsO_4-Lösungen (verschieden gepuffert, ungepuffert, sowie hypo-, iso- und hypertonisch durch Harnstoff, Glyzerin, Dextrose und Saccharose). Formolfixierte Präparate wurden mit Metallen nachkontrastiert. Plexieinbettung durch Hitze mit Peroxyd oder ohne Peroxyd durch UV. Versuche mit anderen Einbettungsmitteln sind im Gang.

Im Zytoplasma liegen dicht Paladesche Granula; die Plasmamatrix ist dazwischen wenig deutlich, am ehesten in Tüpfeln; sie ist ohne auflösbare Struktur. Schraubige Anordnungen (Strugger) sind bei optimaler Fixierung auch an dickeren Schnitten nicht deutlich. Die zahlreichen Lipoidtropfen werden durch Os-Fixierung in ihrer Gestalt nicht erhalten, sehr gut dagegen durch Formol bei Nachkontrastierung mit OsO_4. In allen Zellen finden sich in verschiedener Lage und mitunter in grosser Zahl Pakete von jeweils 3 bis 7 parallelen Doppellamellen, die öfter in kleine Vakuolen münden und vielfach von Vakuolen umgeben sind. Die Schichtabstände und -dicken entsprechen jenen im Golgiapparat tieri-

scher Zellen, wodurch ein Vergleich möglich erscheint. Die Mitochondrien besitzen eine doppelt konturierte Aussenmembran, die innere Lage ragt mit regellos liegenden Ausstülpungen nach innen; Enzymgranula sind allenthalben vorhanden. Die Gestalt der Mitochondrien ist kreisrund bis ellipsoid, nur in telophasischen Zellen verzweigte Formen (Teilungsstadien?). Die Proplastiden sind von einer doppelt konturierten Membran umgeben; im Inneren liegen dichte Membransysteme, die bei der üblichen Fixierung verquellen. Vielfach konnten zahlreiche, stark osmiophile Makromoleküle (Durchmesser 50 Å) gefunden werden, meistens verstreut, in einigen Fällen konzentriert (offenbar Primärgranum). Das Endoplasmatische Reticulum (bisher fast ausschliesslich von tierischen Zellen beschrieben) ist auch hier wohl ausgebildet, sowohl in der «rough-surfaced»-Form (teilweise sogar ausgesprochenes Ergastoplasma), wie auch «smooth-surfaced». Die Vakuolen sind wie die gesamte Zelle jeweils von einer zarten, einfachen osmiophilen Schicht umhüllt.

Die Kernmembran weist porenförmige Gebilde auf; der perinukleare Raum ist äusserst quellungsempfindlich. In Telophasekernen sind mitunter fädige Gebilde sichtbar, die etwa den von Fawcett aus Vertebraten-Spermatozyten (Prophase) beschriebenen entsprechen. Der Phragmoblast hat eine faserig-retikuläre Struktur.

Eine ausführliche Veröffentlichung sowohl der Fixierungs- und Einbettungsstudien wie der Untersuchungen an den Meristemzellen wird vorbereitet.

P. Sitte

Physikalisches Institut der Universität Innsbruck, Laboratorium für Elektronenmikroskopie.

Sur la préparation de thrombocytes humains

Un nouveau procédé d'isolement des thrombocytes permet la préparation de coupes fines de ces éléments en leur conservant une forme très proche de leur état circulant. Cette méthode qui utilise une solution fixatrice anticoagulante et isotonique – récemment commentée dans une note préliminaire – offre de très nets avantages sur les techniques utilisées auparavant. La structure fine des thrombocytes est bien mise en évidence: les organites déjà observés par d'autres auteurs sont fort bien conservés.

Cette technique, d'une application aisée, permet d'envisager non seulement une étude de la physiologie et de la pathologie des plaquettes sanguines, mais également l'utilisation des thrombocytes comme matériel de référence pour l'examen critique des techniques de préparation en cytologie électronique.

R. Feissly, A. Gautier, I. Marcovici

Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Lausanne.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Cortischen Organ des Meerschweinchens

Die Feinstruktur der verschiedenen Elemente des Cortischen Organes des Meerschweinchens wird an Hand verschiedener elektronenmikroskopischer Bilder dargestellt und diskutiert. Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen dem Aufbau der inneren und der äusseren Haarzellen. Währenddem die inneren Haarzellen mit den reichlichen Mitochondrien, dem Golgiapparat und dem endplasmatischen Reticulum die üblichen intrazellulären Strukturen aufweisen, zeigen die äusseren Haarzellen mit der typischen Anordnung der Mitochondrien, dem Hensenschen Körper und der mehrfach geschichteten Zellplasmamembran für andere Körperzellen nicht übliche strukturelle Eigenheiten. Anordnung und Aufbau der 80–100 Sinneshaare pro Zelle sind bei den inneren und äusseren Haarzellen prinzipiell gleich. In den mehrfachen Nervenendigungen an der Basis der Sinneszellen sind deutliche «Synapsengranula» zu erkennen. Es besteht eine deutliche Trennung zwischen Nervenendigungen und Zelleib der Sinneszellen. Unterhalb der Basis der inneren Haarzellen liegen ähnliche Gebilde ohne direkten Kontakt mit der Sinneszelle, die mit den Endigungen der efferenten Fasern des Rasmussenschen Bündels in Beziehung gebracht werden können.

H. Spoendlin

Oto-rhino-laryngologische Klinik des Kantonsspitals, Zürich.

Beziehungen der Leberzelle zum Sinusoid

An Leberpräparaten, die in Vinox eingebettet worden sind, wurden die feinstrukturellen Beziehungen zwischen Sinusoidwand und Leberparenchym untersucht. Elektronenmikroskopisch unterscheidet sich die Wandung des Lebersinusoids von einer gewöhnlichen Kapillare. Eine Basalmembran ist nicht nachweisbar, und die die Sinusoidwand bildenden Kupferzellen liegen den Leberzellfortsätzen direkt auf. Die Kupferzellen bilden kein Syncytium. Sie liegen lose aneinandergereiht, sich überlappend, mit Fortsätzen zapfenartig zwischen die Mikrovilli der Parenchymzelle eindringend, den Leberzellen auf. Interzelluläre Brücken zwischen den Kupferzellen fehlen. Die Sinusoidwand ist diskontinuierlich mit verschieden grossen Lücken und Aussparungen, durch die ein direkter Kontakt zwischen Blut- und Parenchymzellen gewährleistet ist. Der Disséraum ist ein kompliziert gebautes Labyrinthsystem, geformt von den Leberzellfortsätzen und den Zytoplasmaausläufern der Kupferzellen. Im Disséraum liegt das weitmaschige Gitterfasergerüst. Die Lebersinusoide werden wegen ihrer besonderen Bauart als Kapillaren erster Ordnung den gewöhnlichen Kapillaren zweiter Ordnung gegenübergestellt.

J. R. Rüttner und A. Vogel

Histopathologisches Institut der Universität Zürich.

Beiträge der Elektronenmikroskopie zu milchwirtschaftlichen Problemen

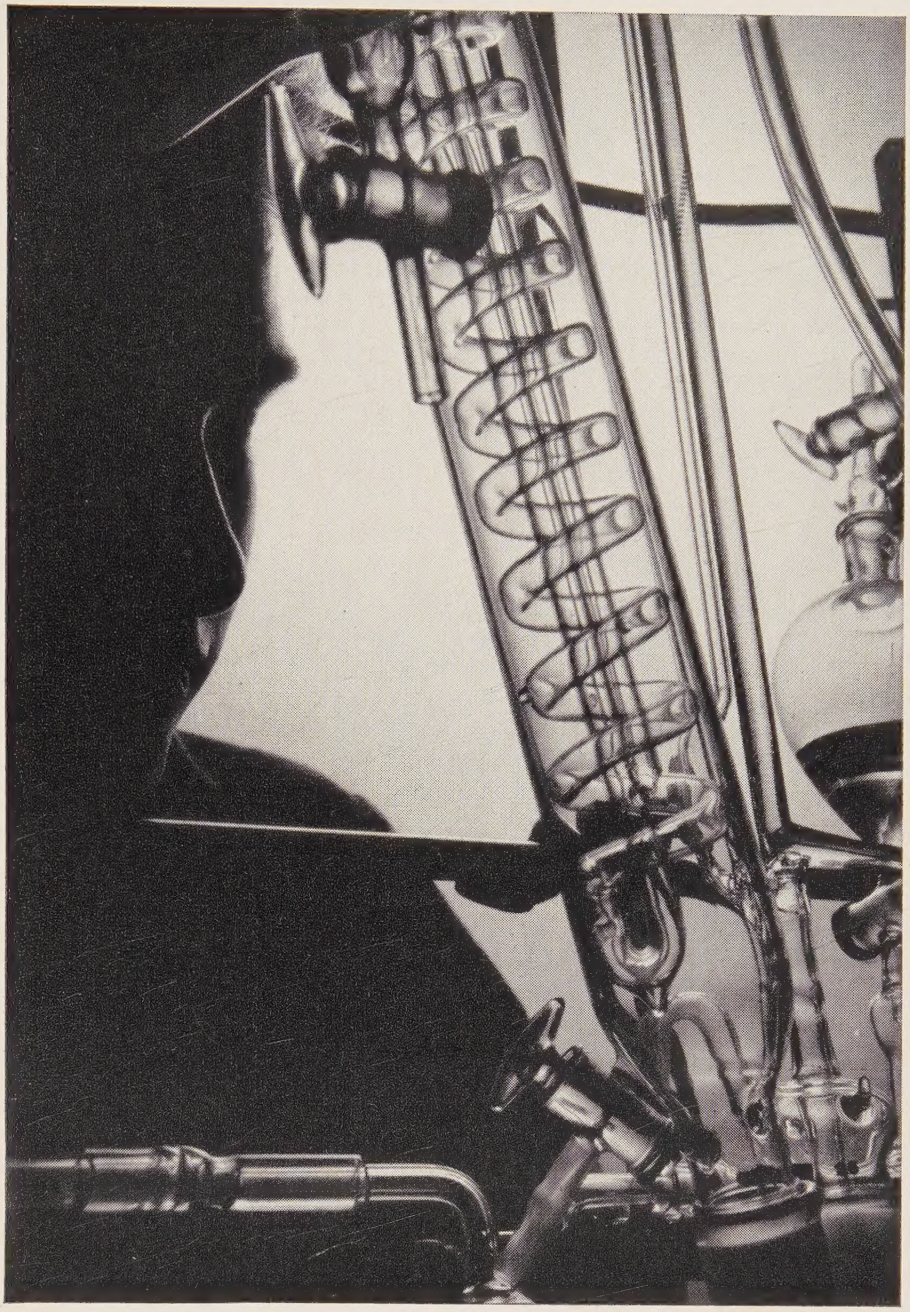
Das Kasein der Kuhmilch bildet ein polydisperses Kugelsol mit Teilchendurchmessern von etwa 10 bis 200 mμ. In der Ziegenmilch ist das Kasein deutlich gröber verteilt, dagegen in der Frauenmilch wesentlich feiner und monodisperser.

Die Gallertbildung der Kuhmilch unter der Wirkung von Säure und Lab vollzieht sich durch Zusammenlagerung der Kaseinteilchen zu unregelmässigen Ketten unter Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes.

Mit Hilfe der Polymethacrylateinbettung kann die Umwandlung des Kaseins von der Gallerte bis zum reifen Käse (Emmentaler, Greyerzer) an Hand von Schnitten verfolgt werden.

K. Imhof

Eidgenössische milchwirtschaftliche Versuchsanstalt, Liebefeld-Bern.



S A N D O Z - Präparate

basieren auf eigenen chemischen

und pharmakologischen Forschungen

sowie weltweiter klinischer

Erfahrung.

SANDOZ

Neuerscheinung Experientia Supplementum VI

25 Jahre hochalpine Forschungsstation Jungfraujoch

Broschiert Fr. 8.30.

Herausgeber:
Prof. Dr. A. von Muralt, Bern

Inhalt:

I. Die Hochalpine Forschungsstation Jungfraujoch, von A. von Muralt, Bern.

II. Klimaphysiologische Untersuchungen in der Forschungsstation Jungfraujoch, von A. von Muralt, Bern.

III. Nouvelles recherches astrophysiques et géophysiques à la Station Scientifique du Jungfraujoch, par Daniel Chalonge, Paris.

IV. Die Bedeutung der Forschungsstation auf dem Jungfraujoch für die Erforschung der kosmischen Strahlung, von F. G. Houtermans und M. Teucher, Bern.

V. The Manchester-CERN Cosmic Ray Experiment at the Jungfraujoch, by J. A. Newth and R. Salmeron, Geneva.

VI. Zur Bedeutung der Hochalpinen Forschungsstation Jungfraujoch für die Glaziologie, von R. Haefeli, Zürich.

VII. L'interprétation du spectre solaire observé au Jungfraujoch, par M. Migeotte, Liège, L. Neven, Uccle, et J. Swensson, Cointe-Sclessin.

VIII. Luftelektrische Untersuchungen am Jungfraujoch, von H. Israël, Aachen.

IX. Bibliographie der Arbeiten aus der Forschungsstation.

Bestellungen nimmt Ihr Buchhändler entgegen

Orders through your bookseller

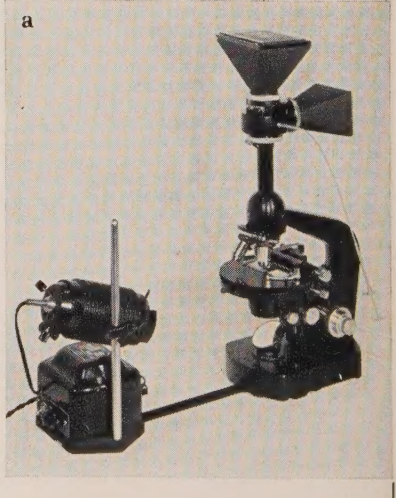
Commandes à votre libraire

Birkhäuser Verlag
Basel und Stuttgart

Mikrophotographien

besser einfacher rascher

Wild offeriert zwei Ausrüstungen, die bei minimalem Aufwand hervorragende Resultate gewährleisten:



a) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Wild-Aufsatzkamera I, Plattenkassette, Mattscheibenstutzen und leistungsfähiger Niedervolt-Mikroskopierlampe.

b) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Phototubus, Wild-Aufsatzkamera II, Kleinbildkassette und Einbaubeleuchtung.

WILD
HEERBRUGG

Prospekt Mi 619 kostenlos durch

Wild Heerbrugg AG.
Heerbrugg / Schweiz